

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“ELABORACIÓN DE PELÍCULAS CON ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE A BASE DE ALGINATO Y POLIFENOLES
EXTRAÍDOS DE LAS MACROALGAS PARDAS DE
Macrocystis pyrifera Y *Lessonia trabeculata*”**

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN
CIENCIAS EN QUÍMICA**

ELABORADA POR:

JUDITH RAMOS CHAVEZ

ASESOR:

Dr. HUGO ARTURO ALARCÓN CAVERO

LIMA – PERÚ

2025

*A mi querida madre Silvia por su gran amor y
apoyo*

A mi estimado padre Juan por su compañía

A mi hermano Luis por su comprensión

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Hugo Alarcón Caveró, docente - investigador y jefe del Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados (GISMA) de la Escuela Profesional de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), por brindarme la oportunidad, los consejos y el apoyo para el desarrollo de esta tesis; asimismo, por orientarme al trabajar bajo su asesoría y principalmente por su comprensión en los momentos necesarios. Del mismo modo, a todos los miembros de GISMA, quienes me apoyaron y me brindaron las instalaciones del laboratorio, los materiales, reactivos y equipos para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Dra. Ana Valderrama Negrón, docente - investigador y jefa del Laboratorio en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET - UNI), por sus consejos, asistencia y por brindarme los contactos necesarios para mi estancia en Brasil, quienes colaboraron para la ejecución de este trabajo de investigación. Asimismo, a los integrantes de LIBIPMET, quienes me facilitaron el uso de materiales y reactivos del laboratorio.

Al Dr. Eder Tadeu Gomes Cavaleiro, docente y jefe del Laboratório de Análise Térmica, Electroanalítica e Química de Soluções (LATEQS) del Instituto de Química de São Carlos de la Universidade de São Paulo (IQSC - USP), por su constante apoyo durante mi estancia en su laboratorio.

A la Dra. Ana Paula Garcia por su asistencia en los ensayos termogravimétricos realizados en el LATEQS y por facilitar las coordinaciones durante mi estadía para realizar las caracterizaciones de mis muestras en los otros laboratorios del IQSC - USP.

Al Dr. Tiago Venancio, docente e investigador de la Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), por el apoyo en la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear en estado sólido de los alginatos extraídos.

Al Dr. Marcelo Luiz Calegari, investigador en la IQSC - USP, por el apoyo en la obtención de los difractogramas de rayos X de los alginatos y las películas.

Al Dr. Márcio de Paula, docente e investigador de la Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) del IQSC - USP, por su asistencia en la obtención de las imágenes de FESEM de las películas.

Al programa de PROCIENCIA/BANCO MUNDIAL por el financiamiento otorgado en el proyecto 01-2018-FONDECYT-BM-IADTUM que permitió la ejecución de este trabajo de investigación.

A todas las personas que me ayudaron y apoyaron de una u otro modo a la culminación de este trabajo de investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES	1
1. PRESENTACIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2.1. Formulación del problema	3
2.2. Sistematización del problema	3
3. ESTADO DEL ARTE	4
4. JUSTIFICACIÓN TÉCNICA Y SOCIAL	10
5. HIPÓTESIS	11
6. OBJETIVOS	12
6.1. Objetivo General	12
6.2. Objetivos Específicos	12
CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO	13
A. CONCEPTOS PREVIOS	13
1. Macroalgas o Algas Marinas	13
1.1. Clasificación de las Algas Marinas	14
1.1.1. Algas Verdes o Chlorophytas	14
1.1.2. Algas Rojas o Rhodophytas	14
1.1.3. Algas Pardas u Ochrophytas - Phaeophyceae	14
1.2. Compuestos Bioactivos de las Algas Marinas	16
2. Florotaninos	17
3. Alginato	20
3.1. Fuentes de obtención	20
3.2. Composición química	21
3.3. Usos y aplicaciones del alginato	24
3.4. Propiedades del alginato	25
3.4.1. Solubilidad	25

3.4.2.	Viscosidad	25
3.4.3.	Gelación	26
3.4.4.	Intercambio iónico	26
3.4.5.	Reticulación con calcio	27
3.5.	Metodologías de extracción	30
4.	Películas y recubrimientos (Biomateriales) en la industria alimentaria	36
4.1.	Composición de los biomateriales	37
4.1.1.	Polisacáridos	38
4.1.2.	Proteínas	38
4.1.3.	Lípidos	38
4.1.4.	Plastificantes	39
4.1.5.	Surfactantes o tensioactivos	42
4.1.6.	Aditivos o Agentes bioactivos	42
4.2.	Técnicas para la elaboración de películas y recubrimientos	43
5.	Pardeamiento enzimático de frutas climatéricas	45
B.	ASPECTOS QUÍMICOS GENERALES	46
1.	Determinación del Contenido Fenólico Total (CFT) por el método de Folin – Ciocalteu	46
2.	Determinación de la Actividad Antioxidante por el método de DPPH	47
3.	Técnicas de Caracterización de Polímeros	48
3.1.	Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido (RMNes)	49
3.2.	Espectroscopia Infrarroja (IR)	51
3.3.	Difracción de Rayos X (DRX)	53
3.4.	Análisis Térmico	54
3.5.	Viscosimetría capilar para la determinación del peso molecular	55
3.6.	Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM)	57
CAPÍTULO III:	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	59
A.	TRATAMIENTO PRELIMINAR	60
1.	Recolección de las muestras	60
2.	Determinación (Identificación) Botánica	61

B. TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	62
1. Reactivos	62
2. Equipos y materiales	63
3. Tratamiento de la muestra	65
4. Obtención de los extractos de las macroalgas pardas	66
5. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos de las macroalgas	68
6. Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos de las macroalgas	69
7. Particionamiento de los extractos de las macroalgas pardas	71
8. Extracción del Alginato de Sodio de las macroalgas pardas de <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Lessonia trabeculata</i>	72
9. Elaboración de las películas cargadas con los extractos de las macroalgas pardas	74
 CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES	 77
A. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS	77
1. Obtención de los extractos de las macroalgas pardas	77
2. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos de las macroalgas	79
2.1. Curva de Calibración	80
2.2. Determinación de la concentración equivalente en las muestras	82
3. Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos de las macroalgas	86
3.1. Ensayo de DPPH de los extractos	86
3.2. Ensayo de DPPH de los particionamientos	90
B. CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO EXTRAÍDO	91
1. Rendimiento de la extracción de alginato de sodio obtenido de las especies de <i>Macrocystis pyrifera</i> y <i>Lessonia trabeculata</i>	91
2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	92
2.1. Condiciones de Trabajo	92
2.2. Características y análisis de los espectros	92

3.	Termogravimetría / Termogravimetría derivativa (TGA/DTG)	96
3.1.	Condiciones de Trabajo	96
3.2.	Características y análisis de los termogramas	96
4.	Difracción de Rayos X (DRX)	99
4.1.	Condiciones de Trabajo	99
4.2.	Características y análisis de los difractogramas	100
5.	Determinación de la Masa Molar promedio mediante Viscosimetría Capilar	103
5.1.	Condiciones de Trabajo	103
5.2.	Cálculos y análisis del ensayo	103
5.2.1.	Alginato referencial (Sigma-Aldrich)	104
5.2.2.	Alginato extraído de la <i>Macrocystis pyrifera</i>	105
5.2.3.	Alginato extraído de la <i>Lessonia trabeculata</i>	107
6.	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ¹ H)	110
6.1.	Condiciones de Trabajo	110
6.2.	Características, cálculos y análisis de los espectros	111
7.	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN ¹³ C)	117
7.1.	Condiciones de Trabajo	117
7.2.	Características y análisis de los espectros	117
C.	CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE ALGINATO	121
1.	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)	121
1.1.	Condiciones de Trabajo	121
1.2.	Características de los espectros	121
1.2.1.	Componentes de las películas	121
1.2.2.	Películas elaboradas a base del alginato referencial y extraídos	122
1.3.	Análisis de los espectros	123
2.	Termogravimetría / Termogravimetría derivativa (TGA/DTG)	131
2.1.	Condiciones de Trabajo	131
2.2.	Características y análisis de los termogramas	131
3.	Difracción de Rayos X (DRX)	136
3.1.	Condiciones de trabajo	136

3.2. Características y análisis de los difractogramas	136
4. Transmitancia de luz y opacidad	139
4.1. Condiciones de Trabajo	139
4.2. Características y análisis de las películas	139
5. Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)	144
5.1. Condiciones de Trabajo	144
5.2. Características y análisis de las imágenes FESEM	144
6. Características físicas de las películas	149
6.1. Condiciones de Trabajo	149
6.1.1. Espesor de las películas	149
6.1.2. Contenido de humedad	149
6.1.3. Solubilidad	149
6.2. Determinación y análisis de los ensayos	150
7. Determinación de la Actividad Antioxidante de las películas	152
7.1. Condiciones de Trabajo	152
7.2. Determinación y análisis del ensayo	152
8. Análisis preliminar del material bioactivo	154
8.1. Condiciones de Trabajo	154
8.2. Análisis preliminar del ensayo	155
CONCLUSIONES	159
PERSPECTIVAS FUTURAS	161
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
ANEXOS	178

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de las algas marinas: Algas Verdes, Algas Rojas y Algas Pardas.	16
Figura 2.	Floroglucinol y estructuras de las clases de Florotaninos presentes en las algas marinas: (a) Floretoles, (b) Fuhaloles, (c) Fucosles, (d) Fucofloretoles, (e) Eckoles y (f) Carmalol.	19
Figura 3.	Estructura química del Alginato. (a) Monómeros constituyentes: ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G); (b) Alginato de sodio; (c) Secuencia de los bloques: Bloque G, Bloque M y Bloque MG.	22
Figura 4.	Formación del gel. (a) Reticulación del alginato con los cationes de calcio en las secuencias de los bloques G de la cadena polimérica (modelo de “caja de huevos”); Posibles combinaciones del alginato – Ca^{2+} para la formación de geles: (b) en los Bloques GG-GG; (c) en los Bloques GM-GM y (d) en los Bloques GM-GG.	28
Figura 5.	Funciones de las películas y recubrimientos en la industria alimentaria.	37
Figura 6.	Interacción de los plastificantes de glicerol y polietilenglicol (PEG) sobre las cadenas poliméricas del alginato.	40
Figura 7.	Proceso de pardeamiento enzimático en frutas climatéricas.	45
Figura 8.	Reacción de reducción del molibdeno (reactivo de Folin – Ciocalteu) frente al ácido gálico (compuesto fenólico) en medio básico.	46
Figura 9.	Método de DPPH. (a) Estructuras resonantes del radical libre de DPPH; (b) Reacción para la eliminación del radical libre de DPPH con ácido gálico.	48
Figura 10.	Zona de recolección de las especies de macroalgas pardas, Paracas.	60
Figura 11.	Esquema del tratamiento de las muestras de macroalgas pardas.	65
Figura 12.	Maceración de las muestras de <i>M. pyrifera</i> y <i>L. trabeculata</i> en distintos solventes.	67
Figura 13.	Elaboración de las películas. (a) Disolución del alginato; (b) Soluciones formadoras; (c) Películas base (AlgRGP) y cargada (AlgRGPExtM); (d) Películas reticuladas.	76
Figura 14.	Diagrama de datos comparativos de los extractos de macroalgas según el solvente.	77
Figura 15.	Ensayo del CFT: a) en los estándares; b) en los extractos de las macroalgas pardas.	79
Figura 16.	Curva de Calibración del: a) ácido gálico (AG); b) floroglucinol (FG).	81
Figura 17.	Diagrama de datos comparativos del CFT de los extractos de macroalgas pardas: a) en distintos medios de extracción, b) a distintas proporciones de etanol.	84
Figura 18.	Tratamiento de los extractos de macroalgas pardas para el ensayo de DPPH*.	86
Figura 19.	Diagrama de datos comparativos del porcentaje de inhibición de los extractos: a) en distintos medios de extracción, b) a distintas proporciones de etanol.	88
Figura 20.	Espectro FT-IR (600 - 4000 cm^{-1}): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #2); d) alginato extraído de las hojas de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #4).	94
Figura 21.	Termogramas (TGA/DTG), en N_2 (30 mL min^{-1}): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #2); d) alginato extraído	97

de las hojas de la *L. trabeculata* (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la *L. trabeculata* (Muestra #4).

Figura 22.	Difractogramas (DRX): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #2); d) alginato extraído de las hojas de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #4).	101
Figura 23.	Viscosimetría del alginato de sodio (Sigma-Aldrich) en NaCl 0.1 M a 25 °C.	104
Figura 24.	Determinación de la viscosidad intrínseca, mediante las ecuaciones de Huggins y Kraemer: a) alginato extraído de las hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1); b) alginato extraído de los tallos de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #2).	106
Figura 25.	Determinación de la viscosidad intrínseca, mediante las ecuaciones de Huggins y Kraemer: a) alginato extraído de las hojas de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #3); b) alginato extraído de los tallos de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #4).	108
Figura 26.	Espectro RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 70 °C) del alginato referencial (Sigma-Aldrich) con ajuste de región. Línea gris producto de la deconvolución del espectro en el rango de 4.40 a 5.20 ppm (Región A, B1, B2, B3, B4 y C). Estructura numerada del Alginato.	113
Figura 27.	Espectro RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 70 °C) del alginato extraído de las Hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1) y del alginato extraído de las Hojas de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #2) con ajuste de región en el rango de 3.40 a 5.20 ppm.	114
Figura 28.	Relación M/G en los espectros RMN ¹ H (500 MHz, D ₂ O, 70 °C) del alginato referencial, de la Muestra #1 (<i>M. pyrifera</i>) y la Muestra #3 (<i>L. trabeculata</i>) en el rango de 4.30 a 5.30 ppm.	116
Figura 29.	Espectro RMN ¹³ C-CP-MAS (100.56 MHz) del alginato referencial (Sigma-Aldrich), del alginato extraído de las Hojas de la <i>M. pyrifera</i> (Muestra #1) y del alginato extraído de las Hojas de la <i>L. trabeculata</i> (Muestra #3). Estructura enumerada para los residuos manuronato (M) y guluronato (G) del alginato.	120
Figura 30.	Espectros FT-IR de la película de alginato, película de alginato reticulada, alginato referencial, glicerol, polietilenglicol y solución de cloruro de calcio.	127
Figura 31.	Espectros FT-IR de las películas de alginato referencial, películas cargadas con los extractos, películas reticuladas, extracto de <i>M. pyrifera</i> y extracto de <i>L. trabeculata</i> .	128
Figura 32.	Espectros FT-IR de la película a base del alginato extraído, películas cargadas con extracto, películas reticuladas, alginato extraído de <i>M. pyrifera</i> y extracto de <i>M. pyrifera</i> .	129
Figura 33.	Espectros FT-IR de la película a base del alginato extraído, películas cargadas con extracto, películas reticuladas, alginato extraído de <i>L. trabeculata</i> y extracto de <i>L. trabeculata</i> .	130
Figura 34.	Termogramas (TGA) de las películas a base del: a) alginato referencial (AlgR), alginato extraído de las macroalgas pardas (AlgM y AlgL), con reticulación de calcio (Ca); b) alginato referencial, alginato extraído c/u cargados con el extracto de <i>M. pyrifera</i> (ExtM), con reticulación de calcio; c) alginato referencial, alginato extraído c/u cargado con el extracto de <i>L. trabeculata</i> (ExtL), con reticulación de calcio.	134
Figura 35.	Curvas DTG de las películas a base del: a) alginato referencial y cargado con los extractos; b) alginato extraído y cargado con el ExtM; c) alginato extraído y cargado con el ExtL. En cada caso con sus reticulaciones de calcio correspondiente.	135

Figura 36.	Difractogramas (DRX) de las películas de alginato referencial, de las películas cargadas con extracto de <i>M. pyrifera</i> , cargado con <i>L. trabeculata</i> y sus reticulaciones con calcio.	137
Figura 37.	Difractogramas (DRX) de las películas a base del: a) alginato extraído y cargado con el extracto de <i>M. pyrifera</i> , s/c reticulación de calcio; b) alginato extraído y cargado con el extracto de <i>L. trabeculata</i> , s/c reticulación de calcio.	138
Figura 38.	Películas del alginato referencial, películas de los alginatos extraídos de cada macroalga, cargados con los extractos hidroalcohólicos de <i>M. pyrifera</i> y <i>L. trabeculata</i> , s/c reticulación.	141
Figura 39.	Espectros de Transmitancia de: a) películas elaboradas con el alginato referencial, películas cargadas con los extractos y reticuladas; b) películas a base de los alginatos extraídos, películas cargadas con sus respectivos extractos y reticuladas.	142
Figura 40.	Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato referencial y sus variaciones.	146
Figura 41.	Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato extraído de la <i>Macrocystis pyrifera</i> , las películas cargadas con el extracto y las películas reticuladas con calcio.	147
Figura 42.	Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato extraído de la <i>Lessonia trabeculata</i> , las películas cargadas con el extracto y las películas reticuladas con calcio.	148
Figura 43.	Diagrama de datos comparativos de la actividad antioxidante de las películas.	152
Figura 44.	Ensayo con las películas de alginato en las paltas a los días 1, 7, 14 y 21. Palta sin cubrir (Control, M ₀), palta cubierta con la película base (M ₁) y palta cubierta con la película cargada con extracto de <i>M. pyrifera</i> (M ₂).	156
Figura 45.	(a) Palta Control al día 1, (b) Palta Control al día 21, (c) Palta recubierta al día 21, (d) Vista interna de la palta recubierta al día 21.	157
Figura 46.	Ensayo del recubrimiento con alginato cargado con los extractos de macroalgas pardas en las paltas, desde el día 1 hasta el día 21.	158

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Resumen de películas y recubrimientos bioactivos.	7
Tabla 2.	Resumen del Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante en macroalgas.	9
Tabla 3.	Porcentaje del residuo manurónico (M) y gulurónico (G), relación M/G y rendimiento del alginato en distintas especies de macroalgas.	23
Tabla 4.	Procesos comparativos para la obtención del alginato a partir de algas marinas.	34
Tabla 5.	Terminologías de la viscosimetría.	56
Tabla 6.	Clasificación taxonómica de las macroalgas pardas recolectadas de Paracas.	61
Tabla 7.	Reactivos para el trabajo experimental.	62
Tabla 8.	Equipos para el trabajo experimental.	63
Tabla 9.	Equipos y laboratorios de ejecución para las caracterizaciones.	64
Tabla 10.	Cantidades obtenidas luego del tratamiento de las muestras.	65
Tabla 11.	Constituyentes de las películas a base del alginato referencial y alginatos extraídos.	75
Tabla 12.	Rendimientos obtenidos de los extractos de las macroalgas pardas.	78
Tabla 13.	Curva de calibración en base al patrón de ácido gálico (AG) y floroglucinol (FG).	80
Tabla 14.	Contenido Fenólico Total de los extractos de las macroalgas pardas.	83
Tabla 15.	Porcentaje de Inhibición y CI_{50} de los extractos de las macroalgas pardas	87
Tabla 16.	Porcentaje de Inhibición de los particionamientos obtenidos de los extractos.	90
Tabla 17.	Rendimiento del alginato extraído de las macroalgas pardas.	91
Tabla 18.	Señales características en los espectros de FT-IR de los alginatos extraídos.	93
Tabla 19.	Resultados de la termogravimetría en atmósfera inerte de los alginatos.	96
Tabla 20.	Resultados de los difractogramas de los alginatos referencial y extraídos.	100
Tabla 21.	Datos del análisis de viscosimetría capilar para el alginato referencial.	104
Tabla 22.	Resultados de la masa molar promedio del alginato referencial para cada especie.	105
Tabla 23.	Datos del análisis de viscosimetría capilar para los alginatos extraídos de las hojas (Muestra #1) y tallos (Muestra #2) de la <i>Macrocystis pyrifera</i> .	105
Tabla 24.	Datos del análisis de viscosimetría capilar para los alginatos extraídos de las hojas (Muestra #3) y tallos (Muestra #4) de la <i>Lessonia trabeculata</i> .	107
Tabla 25.	Resumen de los resultados de la masa molar promedio de los alginatos.	109
Tabla 26.	Asignación del espectro RMN ¹ H del alginato en el rango de (δ) 4.40 a 5.20 ppm.	112
Tabla 27.	Parámetros para las fracciones (mónadas, dúos, triadas) del alginato.	115
Tabla 28.	Asignación del espectro RMN ¹³ C-CP-MAS del alginato.	119
Tabla 29.	Señales características en los espectros FTIR de los componentes de las películas.	121
Tabla 30.	Señales características en los espectros FTIR de las películas elaboradas.	122
Tabla 31.	Valores comparativos de las señales de vibración de estiramiento asimétrico y simétrico del carboxilato (-COO ⁻) antes y después de la reticulación con calcio.	126
Tabla 32.	Resultados de la termogravimetría en atmósfera inerte de las películas.	133
Tabla 33.	Valores del Espesor, Transmitancia y Opacidad de las películas en el UV-Vis.	140
Tabla 34.	Características físicas de las películas: espesor, humedad y solubilidad.	150

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AG	Ácido Gálico
Bloque M	α -D-manuronato
Bloque G	β -L-guluronato
°C	Grado centígrado
DPPH	Radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DRX	Difracción de Rayos X
EAG o Eq AG	Equivalente de Ácido Gálico
EFG o Eq FG	Equivalente de Floroglucinol
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de la Alimentación y Agricultura)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FESEM	Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo
FG	Floroglucinol
FT-IR	Espectroscopía Infrarrojo por Transformada de Fourier
FPS	Factor de Protección Solar
g - mg	gramo - miligramo
h	hora
IC₅₀ - CI₅₀	Concentración de Inhibición media
Kg	Kilogramo
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
PEG	Polietilenglicol
PPO	Polifenoloxidasas
RMNes	Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido
TGA	Thermogravimetric analysis (Análisis Termogravimétrico)
TCI₅₀	Tiempo de la Concentración de Inhibición media
μm	micrómetro
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

Las macroalgas han sido utilizadas desde la antigüedad como fuente de alimentos por su alto valor nutricional. Actualmente, en las industrias se emplean las macroalgas pardas para la obtención de alginato, el cual por su variabilidad es empleado en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria como agentes espesantes, moldeadores y gelificantes según sea su calidad. El Perú cuenta con una diversidad de macroalgas, las cuales contienen diferentes polisacáridos y metabolitos bioactivos que pueden obtenerse en una extracción por fases, siendo estos el alginato y los compuestos polifenólicos, de este modo se busca aprovechar y maximizar el proceso de extracción. La característica gelificante del alginato lo hace factible para la elaboración de películas; en adición, el empleo de aditivos naturales bioactivos confieren a las películas la acción antioxidante, antimicrobiana entre otros. Por tal motivo, esta investigación se enfocó en aprovechar el proceso de extracción a fin de obtener las materias primas para la elaboración de películas bioactivas. Este trabajo muestra los análisis comparativos del contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante de dos macroalgas pardas en distintos medios de extracción; con valores de 94.13 y 187.70 mg EAG/100g MS para los extractos hidroalcohólicos de las hojas de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata* respectivamente. Además, el potencial antioxidante de los extractos frente al DPPH fue del 81.74 % y 84.45 % de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata* respectivamente. A partir de las macroalgas pardas se obtuvo también el alginato de sodio con rendimientos de extracción del 17.99 % de la *M. pyrifera* y 26.89 % de la *L. trabeculata*. La caracterización de los alginatos obtenidos se realizó mediante su análisis por FTIR, TGA, DRX, RMN¹H, RMN¹³C en estado sólido y se determinó la masa molar promedio por ensayos de viscosimetría capilar. A partir de los alginatos y de los extractos hidroalcohólicos extraídos de las macroalgas pardas se elaboraron películas bioactivas, los cuales fueron analizados por sus propiedades físicas (solubilidad, humedad, espesor), caracterizadas por FTIR, TGA, DRX, opacidad, FESEM y se determinó la capacidad antioxidante de cada película, siendo mayor la acción en películas cargadas con extractos de *L. trabeculata*; asimismo, las películas evidenciaron un incremento de la opacidad al agregar los extractos. En adición, el análisis preliminar de las películas bioactivas frente a paltas Hass evidenció una reducción del pardeamiento y deterioro del fruto hasta 21 días del análisis.

Palabras clave: Alginato, macroalgas pardas, antioxidantes, películas bioactivas

ABSTRACT

Macroalgae have been used since ancient times as a source of food for their high nutritional value. Currently, brown macroalgae are used in industries to obtain alginate, which due to its variability is used in the cosmetic, pharmaceutical and food industries as thickening, molding and gelling agents depending on their quality. Peru has a diversity of macroalgae, which have different contents of polysaccharides and bioactive metabolites that can be obtained in a phased extraction, these being alginate and polyphenolic compounds, in this way we seek to take advantage and maximize the extraction process. The gelling characteristic of alginate makes it feasible for making films; additionally, the use of bioactive additives gives the films antioxidant and antimicrobial action, among others. For this reason, this research focused on taking advantage of the extraction process in order to obtain raw materials for the production of bioactive films. This work shows the comparative analyzes of the total phenolic content and antioxidant activity of two brown macroalgae in different extraction solvents; with TPC values of 94.13 and 187.70 mg GAE/100g dw for the hydroalcoholic extracts of the leaves of *M. pyrifera* and *L. trabeculata* respectively. In addition, the antioxidant potential of the extracts against DPPH was 81.74 % and 84.45 % of *M. pyrifera* and *L. trabeculata* respectively. From brown macroalgae, sodium alginate was also obtained with extraction yields of 17.99 for *M. pyrifera* and 26.89 for *L. trabeculata*. The characterization of the alginate was determined by FTIR, TGA, XRD, ¹H-NMR, ¹³C-NMR in solid state and the average molar mass was determined by capillary viscometry tests. From the alginates and the hydroalcoholic extracts obtained from the brown macroalgae, bioactive films were prepared, which were analyzed for their physical properties (solubility, humidity and thickness), characterized by FTIR, TGA, XRD, opacity, FESEM and the antioxidant capacity of each film was determined, with an inhibition percentage between 40 – 50 %; likewise, the films showed an increase in opacity when the extracts were added. In addition, the preliminary analysis of the bioactive films against Hass avocados indicated a reduction in browning and deterioration of the fruit up to 21 days after the analysis.

Keywords: Alginate, macroalgae, polyphenols, antioxidants, bioactive films

CAPÍTULO I.

APECTOS GENERALES

1. PRESENTACIÓN

Las macroalgas proliferan a lo largo del litoral, existiendo una diversidad de especies, los cuales han sido empleados desde la antigüedad en la medicina y como fuente de alimento debido a sus propiedades nutritivas (Quitral R. et al., 2012). Actualmente, en las industrias se emplean las macroalgas pardas para la obtención del alginato (Imeson, 2009), cuya calidad depende tanto de la especie como del proceso de extracción. El alginato es empleado principalmente como agente estabilizante, espezante o gelificante en la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia (Avendaño et al., 2013). Adicionalmente, por las propiedades gelificantes del alginato, así como a la variabilidad de sus características y a la capacidad de retener en su matriz polimérica otros componentes, puede ser empleado en la elaboración de películas con fines en la preservación de alimentos o en el campo biomédico. Asimismo, si bien se puede extraer el polisacárido de las macroalgas pardas, estas también poseen en su pared celular otros compuestos que brindan protección a la especie y otorgan distintas propiedades bioactivas como la capacidad antioxidante, antimicrobiana entre otros, los cuales son dados por los metabolitos presentes en las macroalgas. Por tal motivo, el enfoque de este trabajo de investigación fue obtener las materias primas esenciales a partir de las especies de macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata* procedentes de Paracas para elaborar una película con capacidad antioxidante que podría emplearse como empaques para alimentos o en base a sus características brindar una barrera de protección antioxidante para preservar productos de la agroindustria o agroexportación, entre estos a los diversos frutos climatéricos.

La película desarrollada es a base de alginato de sodio como matriz polimérica y tiene incorporado un extracto hidroalcohólico, ambas materias primas fueron obtenidos de las mismas macroalgas pardas en estudio, de esta manera se aprovecha mejor el proceso de extracción; este aditivo natural es el que le confiere la acción antioxidante.

A continuación, se resumen las actividades realizadas en esta investigación.

- a) La primera parte comprendió tres actividades
 - i. Recolección de las muestras de macroalgas pardas, las cuales se localizaron frente a la isla Zárate y los farallones (Paracas) a 3.5 Km al suroeste de la playa Supay ($76^{\circ}17'48.10''$ L.W. y $13^{\circ}59'58.77''$ L.S.) y a una profundidad de 6 metros.
 - ii. Identificación botánica de las muestras de macroalgas pardas.
 - iii. Búsqueda bibliográfica de las macroalgas de estudio y materiales poliméricos.
- b) El trabajo experimental, realizado en los ambientes del Grupo de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados (GISMA) y del Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, comprendió las siguientes actividades:
 - i. Lavado, secado y molienda de las muestras de macroalgas pardas.
 - ii. Preparación de los extractos hidroalcohólicos en ambas especies de macroalgas.
 - iii. Determinación del Contenido Fenólico Total (CFT) de los extractos de macroalgas por el método de Folin - Ciocalteu.
 - iv. Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos de macroalgas por el método del radical libre de DPPH
 - v. Extracción del alginato de sodio a partir de las dos especies de macroalgas pardas.
 - vi. Elaboración de películas a base de alginato cargados con extractos hidroalcohólicos, ambos obtenidos de las macroalgas pardas de estudio.
- c) Estudio, interpretación y análisis de datos, en donde se realizó:
 - i. Caracterización del alginato de sodio extraídos de las macroalgas pardas mediante su análisis por FTIR, TGA, DRX, RMN¹H, RMN¹³C en estado sólido y viscosimetría capilar para la determinación de su masa molar promedio.
 - ii. Evaluación de la actividad antioxidante de las películas bioactivas.
 - iii. Caracterización de las películas con capacidad antioxidante mediante su análisis por FTIR, TGA, DRX, FESEM, opacidad y propiedades físicas.
 - iv. Estudio preliminar del tiempo de preservación de paltas Hass recubiertas con las películas bioactivas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1. Formulación del problema

Los estándares de exportación de productos agrícolas en el Perú cada vez son más exigentes debido a la competencia en el mercado agroindustrial. Asimismo, parte de los productos agrícolas (frutas y hortalizas) postcosecha se deterioran o descomponen en el trayecto de su destino, tanto del mercado local como del exterior, debido a distintos factores como daños por manipulación, almacenamientos inadecuados o por ataque de bacterias y microorganismos patógenos, generando pérdidas económicas. En décadas anteriores se utilizaban conservantes químicos para mantener las frutas y hortalizas en buen estado; sin embargo, estudios revelaron que el uso de estos conservantes produce intoxicaciones y enfermedades degenerativas tras su constante consumo (Rodríguez Saucedo, 2011). También, el uso descontrolado del plástico para envasar alimentos genera una problemática medioambiental debido a que los plásticos pueden perdurar siglos hasta descomponerse afectando distintos ecosistemas y a sus habitantes. En la búsqueda de alternativas eco-amigables para preservar y envasar alimentos surgió el estudio de los biomateriales (recubrimientos y películas a base de materia orgánica). Actualmente, se busca desarrollar materiales bioactivos, así como también mejorar las características y propiedades de las películas y/o recubrimientos; en ese sentido, ¿De qué manera la incorporación de un extracto en una matriz polimérica a base de alginato de sodio, ambos extraídos de las macroalgas pardas, permitiría la obtención de matrices bioactivas con posible actividad antioxidante que podría ser empleado como material de empaque o de preservación?

2.2. Sistematización del problema

- ¿Cómo influye la temperatura, el medio y el tiempo en los procesos de extracción del alginato en distintas especies de macroalgas pardas y cuanto sería el rendimiento?
- ¿De qué forma la proporción de los residuos manurónico (M) y gulurónico (G) del alginato de sodio influye en la elaboración de películas y/o recubrimientos?
- ¿Cómo influye el solvente en la obtención de los extractos de las macroalgas pardas con respecto al contenido total de polifenoles y su posible bioactividad?
- ¿Cómo se puede elaborar películas y/o recubrimientos inteligentes o bioactivas a partir de distintas especies de macroalgas pardas?

3. ESTADO DEL ARTE

Actualmente, el ritmo de vida del hombre demanda el consumo de plásticos para todo tipo de actividades, debido a la practicidad del plástico puede emplearse para envasar, transportar, recubrir, contener entre otros; sin embargo, el uso excesivo del plástico genera un impacto medioambiental debido a que el plástico tarda muchos años en descomponerse; es así, como surgen las islas de plástico, producto de la acumulación de toneladas de residuos plásticos que acaban en los océanos. En el mar, el plástico se fragmenta a micropartículas por la acción del sol, agentes externos o microorganismos. Estas micropartículas se dispersan en todo el medioambiente afectando a todo ser vivo, siendo los ecosistemas oceánicos y fluviales los de mayor impacto (Ahmadi Asadi, 2023; Cohen, 2016).

Con relación al cuidado del medioambiente, la búsqueda de nuevos materiales como sustituyentes del plástico, ha llevado al estudio y elaboración de películas y/o recubrimientos a base de materia orgánica (naturales) como el almidón, la celulosa, la gelatina, el quitosano, el pullulan entre otros; obtenidos de fuentes de origen animal, vegetal o microbiana. En adición, la integración de aditivos naturales o sintéticos en las películas y/o recubrimientos, les otorga propiedades bioactivas (acción antioxidante, antibacteriana, etc.). En los casos de la industria de alimentos y la agroindustria, enfocados en el desarrollo y preservación de frutas y verduras, el empleo de películas y/o recubrimientos bioactivos permite proteger e incluso puede incrementar el tiempo de vida útil de los productos alimenticios de interés; de esta manera, los nuevos materiales pueden moldearse a las necesidades del consumidor en relación a la inocuidad, tamaño, ergonomía y a la calidad del producto (Eslami et al., 2023; Palma-Rodríguez et al., 2017; Parreidt et al., 2018).

Las películas y/o recubrimientos proporcionan una cubierta protectora en el alimento y su impacto en el ambiente no es dañino debido a que son biodegradables a comparación del plástico; por lo tanto, representan una mejor alternativa de uso. Una fuente natural para formar películas son los recursos hidrobiológicos; entre estos, el quitosano producto de la desacetilación parcial de la quitina obtenida del exoesqueleto de los crustáceos como los cangrejos y las langostas (Lárez Velásquez, 2003); otros son las macroalgas pardas, cuyo esencial componente de extracción es el alginato que representa entre el 25 % al 40 % en peso seco de la macroalga. El alginato tiene como principal característica la de gelificarse y espesarse; es decir, tiende a estabilizar las películas al momento de su formación (Avendaño

et al., 2013). Asimismo, las macroalgas presentan una variedad de metabolitos secundarios con distintas actividades. Entre los posibles beneficios se encuentran sus propiedades antioxidantes (Batista González et al., 2009; Kadam et al., 2015), antifúngicas, antibacterianas (Ríos et al., 2009), antiinflamatorias (Catarino et al., 2021) y fotoprotectoras (Pangestuti et al., 2018; Sinjal et al., 2018)

Un estudio a las propiedades bioactivas del extracto de la *Lessonia nigrescens* Bory indicó la actividad antioxidante, antielastasa, anticolagenasa y un efecto protector de UV, en base a ello se desarrolló una crema dermatológica, cuyo principal compuesto identificado fue el ácido gálico (0.629 mg g^{-1} de alga), el cual realiza la mayoría de las actividades mencionadas. La actividad antioxidante, antielastasa y anticolagenasa del compuesto indicaron valores de IC_{50} de 11 mg mL^{-1} , 6.2 mg mL^{-1} y 50.1 mg mL^{-1} respectivamente, valores mayores frente a un control de Trolox y su actividad fotoprotectora fue comparable al factor de protector solar (FPS) 50 (Giurfa Tutaya & Oblitas Barboz, 2017).

Otro estudio con relación a los extractos de *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rígida* muestra una actividad antioxidante del 81.4 % y 79.5 % respectivamente; asimismo, determinaron que el CFT presentes era de 208.2 y 83.8 mg EAG/100 g alga respectivamente; sin embargo, estos resultados se ven influenciados por el solvente, la temperatura, el tiempo y la relación de muestra - solvente de extracción, por lo que los resultados pueden variar significativamente (Consuegra, 2014).

Entre los compuestos con actividad antioxidante se encuentran los florotaninos y los flavonoides presentes en las macroalgas pardas de *Durvillaea antártica*, *Lessonia spicata* y *Macrocystis integrifolia* procedentes de Chile. Estos compuestos son capaces de retrasar la oxidación al capturar los radicales libres, siendo favorables para el tratamiento de cáncer. Los análisis de la actividad antioxidante por DPPH infirió valores de IC_{50} de 0.97 mg mL^{-1} (*D. antártica*), 1.24 mg mL^{-1} (*L. spicata*) y 1.07 mg mL^{-1} (*M. integrifolia*). Es así como los distintos polifenoles y metabolitos extraídos en estas macroalgas pueden servir como materia prima para la industria alimenticia y farmacéutica (Olate-Gallegos et al., 2019).

Entre los estudios para la elaboración de empaques funcionales, las películas y recubrimientos a base de alginato redujeron la deshidratación y brindaron protección a frutas cortadas como manzana, papaya, pera y melón (Ferreira et al., 2016).

El desarrollo de películas a base de alcohol polivinilo cargado con extracto del alga roja de *Kappaphycus alvarezii* evidenció la acción antioxidante y antibacteriana frente al *S. aureus* y al *B. cereus*; además, las películas presentaron buenas propiedades mecánicas y de barrera (Kanatt et al., 2015); por ende, el cargado de películas con extractos de algas puede brindar beneficios adicionales.

En base a lo descrito, se plantea trabajar con macroalgas para la obtención de las materias primas (alginato y extractos) de las películas. Además, dependiendo de las características del alginato extraído y de la capacidad bioactiva de los extractos obtenidos, se propone elaborar películas con distintas propiedades y evaluar las características de distintas especies de macroalgas pardas.

En la **Tabla 1** se resumen distintos trabajos de investigación para la elaboración de películas y/o recubrimientos con contenido activo (natural y/o sintético) empleados en la industria alimentaria y en la **Tabla 2** se muestran los resultados del contenido fenólico total y la actividad antioxidante de distintas macroalgas pardas; estos trabajos se consideraron como referentes para la realización de este trabajo de investigación.

Tabla 1*Resumen de películas y recubrimientos bioactivos.*

MATRIZ	REACTIVOS	COMPONENTE ACTIVO	RESULTADOS	REFERENCIA
Alginato	Glicerol CaCO ₃ Glucono delta - lactona (GDL)	Extracto de Jamaica	Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i>, <i>S. typhimurium</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>B. subtilis</i>	(Aydin & Zorlu, 2022)
Alginato	Glicerol	Extracto de Nuez	- Actividad antibacteriana frente a <i>E. coli</i>, <i>S. aureus</i> - Actividad antioxidante: 75.8 % - Contenido fenólico: 192.66 mg EAG/g	(Aloui et al., 2021)
Alginato	Glicerol	<i>Meyerozyma caribbica</i>	- Preservación de Palta <i>Persea</i> por 12 días - Mejora de las propiedades térmicas	(Iñiguez-Moreno et al., 2021)
Alginato	Glicerol	Semillas de algodón	- Actividad antioxidante: 82 % - Actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> - Solubilidad del 90 % en agua	(Oliveira Filho et al., 2019)
Alginato	Tween 80 CaCl ₂	Aceite esencial de limoncillo	- Incremento de la opacidad - Solubilidad del 75 % en agua	(Cofelice et al., 2019)
Alginato	Glicerol CaCl ₂	Chokeberry negro (BCE)	- Actividad antioxidante: 32.96 % - Contenido fenólico: 25 mg EAG/g - Solubilidad del 82.89 % en agua	(S. Kim et al., 2018)
Alginato Pectinas	Glicerol CaCl ₂	Eugenol Ácido cítrico	- Preservación de Frambuesas por 14 días - Actividad antimicrobiana - Actividad antioxidante	(Guerreiro et al., 2015)
Alginato	Glicerol CaCl ₂	Aceite esencial de limoncillo y girasol Ácido ascórbico Ácido cítrico	- Preservación de piñas cortadas por 16 días - Actividad antimicrobiana - Reducción en la pérdida de peso - Preservación del color y firmeza	(Azarakhsh et al., 2014)
Alginato	CaCl ₂	Aceite de girasol Ácido ascórbico Ácido cítrico	- Preservación de Mango Kent cortados por 12 días - Actividad antioxidante: 60 % - Enriquecimiento de la Vitamina C	(Robles-Sánchez et al., 2013)
Alginato	Glicerol Lactato de calcio	Cinamaldehído	- Preservación de Sandías <i>Citrullus lanatus</i> cortadas de 12 a 15 días - Actividad antimicrobiana	(Sipahi et al., 2013)

MATRIZ	REACTIVOS	COMPONENTE ACTIVO	RESULTADOS	REFERENCIA
Quitosano	Glicerol	Hongos <i>T. terreum</i>	- Actividad antioxidante: 84 % - Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	(Koc et al., 2020)
Quitosano	Glicerol	Aceite esencial de canela	Actividad antioxidante: 42 %	(T. Xu et al., 2019)
Quitosano	Glicerol	Ácido <i>protocatecuico</i>	- Actividad antioxidante: 35 % - Solubilidad en agua del 17.9 %	(Liu et al., 2017)
Gelatina Goma de anacardo	Glicerol Tween 80	Aceite esencial de limón	- Preservación de pan - Solubilidad en agua del 3 %	(M. A. Oliveira et al., 2020)
Gelatina (piel de conejo)	Glicerol	Ácido de romero	- Preservación de Tocino - Solubilidad en agua del 21.86 %	(X. Zhang et al., 2019)
Gelatina (pescado)	Glicerol	Cáscara de granada	- Actividad antioxidante: 65 % - Actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> - Solubilidad en agua del 55.97 %	(Hanani et al., 2019)
Gelatina (piel bovina)	Glicerol	Centella asiática	Actividad antioxidante: 45.8 %	(Rasid et al., 2018)
Gelatina (piel bovina) Almidón (cúrcuma)	Glicerol	Ácido tánico Ácido cafeico Extracto de té verde	- Actividad antioxidante: 70 % - Solubilidad en agua del 32 %	(Choi et al., 2018)
Gelatina (pescado)	Glicerol	Aloe Vera	- Actividad antioxidante: 70 % - Solubilidad en agua del 56.78 %	(Sui Chin et al., 2017)
Gelatina (piel bovina)	Glicerol	<i>Ascophyllum nodosum</i> (macroalga parda)	- Actividad antioxidante: 61.46 % - Contenido fenólico: 15.6 mg EFG/100 g	(Kadam et al., 2015)
Carboximetil celulosa		Moringa hojas y semillas	- Preservación de Palta Hass - Actividad antifúngica frente a <i>C. gloeosporioides</i>	(Tesfay et al., 2017)
Almidón (Tapioca) Celulosa	Glicerol	Uva Cabernet Franc	- Contenido fenólico: 7.94 µg EAG/g - Actividad antimicrobiana frente a <i>S. aureus</i>, <i>L. monocytogenes</i>	(Y. Xu et al., 2018)
Almidón (yuca)	Glicerol Lecitina de soja	Cáscara de calabaza Aceite esencial de orégano	Actividad antioxidante: 60.5 %	(dos Santos Caetano et al., 2018)
Almidón (Plátano) Agar	Glicerol	Nanopartículas de plata	- Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> - Solubilidad del 12.9 % en agua	(Orsuwan et al., 2016)

Nota. EAG: Equivalente de ácido gálico; EFG: Equivalente de floroglucinol; Actividad antioxidante por el método de DPPH.

Tabla 2

Resumen del Contenido Fenólico Total y Actividad Antioxidante en macroalgas.

ESPECIE	PROCEDENCIA	OBTENCIÓN	RESULTADOS	REFERENCIA
<i>Lessonia spicata</i>	Valparaíso	Solvente: EtOH 50%	• 121 mg EFG/100 g MAs • IC ₅₀ : 1.24 mg/mL	(Olate-Gallegos et al., 2019)
<i>Macrocystis integrifolia</i>	(Chile)	Temperatura ambiente	• 370 mg EFG/100 g Mas • IC ₅₀ : 1.07 mg/mL	
<i>Lessonia trabeculata</i>	Marcona (Perú)	Solvente: EtOH 96 y 70% Relación: 1:10 Temperatura ambiente	• EtOH 96%: 10.16 mg EAG/100 g MAs; % Inhibición: 7.53 • EtOH 70%: 12.82 mg EAG/100 g MAs; % Inhibición: 12.16	(Apumayta, 2019)
<i>Lessonia trabeculata</i>	IMARPE (Perú)	Solvente: MeOH: Cloroformo (2:1)	• 148.89 mg EAG/100 g Mas • IC ₅₀ : 1.98 mg/mL • % Inhibición: 75.63	(Fernandez-Burgos, 2017)
<i>Lessonia nigrescens</i> <i>Bory</i>	Marcona (Perú)	Solvente: MeOH, EtOH 50% T (°C): 40	• 60.4 mg EAG/100 g MAs • % Inhibición: 69.6	(Giurfa Tutaya & Oblitas Barboz, 2017)
<i>Polysiphonia paniculata</i>	Perú	Solvente: DCM y EtOH Relación: 1:10 Temperatura ambiente	• DCM: 175.2 mg EAG/100 g MAs; IC ₅₀ : 0.35 mg/mL • EtOH: 142.6 mg EAG / 100 g MAs; IC ₅₀ : 1.01 mg/mL	(González et al., 2017)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Marcona (Perú)	Solvente: EtOH 50%	• 0.598 mg EAG/100 g MAs • IC ₅₀ : 0.38 mg/mL	(Castro et al., 2016)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Chile	Solvente: EtOH 25 y 75% T (°C): 25, 37 y 70	• EtOH 25%: 208.2 mg EAG/100 g MAs; % Inhibición: 81.4 • EtOH 75%: 374.1 mg EAG/100 g MAs; % Inhibición: 84.9	(Consuegra, 2014)

Nota. EAG: equivalente de ácido gálico; EFG: equivalente de floroglucinol; IC₅₀: coeficiente de inhibición media; MAs: Macroalga seca; DCM: diclorometano; EtOH: etanol; MeOH: metanol.

4. JUSTIFICACIÓN TÉCNICA Y SOCIAL

Actualmente, el Perú se encuentra entre los principales proveedores de frutas a nivel internacional. Entre los años 2021 y 2022, los productos de exportación más demandados fueron las paltas, fresas, granadas, arándanos, uvas y mangos, siendo los países de destino Estados Unidos, Canadá, España, China y Reino Unido (Gestión, 2023). En adición, existen otras frutas climatéricas, consumidas en el mercado nacional y con perspectivas al exterior. Las frutas climatéricas son aquellas que continúan su proceso de maduración luego de la recolección, como son las manzanas, plátanos, paltas, entre otros. En ambos casos, tanto en el mercado interno como el externo, la apariencia del fruto es primordial; por ende, se debe tener mucho cuidado en el manejo (almacenamiento y transporte) de frutos climatéricos a fin de que puedan llegar frescos a los consumidores; sin embargo, existe un porcentaje de productos (frutas y hortalizas) postcosecha que no perduran hasta su destino final. Acorde a la FAO, las pérdidas postcosechas de productos agrícolas a nivel mundial representan más del 40%. En el Perú, estas pérdidas van principalmente a los tomates (42.9%) y plátanos (40.8%); entre las causantes de estas pérdidas se consideran los problemas por plagas, almacenamiento, transporte, empaquetado entre otros (Rosales, 2019). Por lo general, los frutos recolectados están alrededor de dos a tres semanas almacenados hasta que lleguen al consumidor o país destino; por ello, la importancia de buscar nuevas tecnologías para la preservación de alimentos y poder prolongar el tiempo de vida útil. Otras consideraciones son los estados de desarrollo del fruto tales como la madurez fisiológica, madurez de consumo (óptimas propiedades organolépticas), ablandamiento y senescencia del fruto (Martínez-González et al., 2017) a fin de buscar soluciones para su fortalecimiento. Como una alternativa para la conservación de productos hortofrutícolas (frutas y verduras) está el empleo de películas y/o recubrimientos de origen natural como polisacáridos, proteínas y lípidos, los cuales otorgan distintas propiedades fisicoquímicas, mecánicas y de barrera (Ferreira et al., 2016; Solano-Doblado et al., 2018). Asimismo, el uso de aditivos naturales o sintéticos pueden repotenciar las características de las películas y/o recubrimientos, siendo selectivo según la funcionalidad del aditivo; por ejemplo, el empleo de antioxidantes permite la protección contra la luz, retarda la degradación y rancidez oxidativa, así como disminuye los procesos oxidativos que conlleva a la madurez de las frutas (De Ancos et al., 2015; Parreidt et al., 2018; D. Zhang et al., 2018). Entre aditivos o agentes bioactivos se pueden emplear aceites esenciales, principios activos o extractos con alto contenido de polifenoles

capaces de desarrollar distintas actividades; por ejemplo, extractos a base de algas marinas pueden evidenciar actividad antimicrobiana (Eom et al., 2012), antioxidante, fotoprotectora (Singh & Sidana, 2013), entre otros. Otro regulador en las características de las películas y/o recubrimientos son los agentes reticuladores, los cuales también pueden modificar las propiedades mecánicas, de barrera, retardar el ablandamiento y decoloración de alimentos, entre otros (Giz et al., 2020; Urquiza et al., 2011); por consiguiente, la sinergia de los constituyentes de las películas y/o recubrimientos pueden prolongar la vida útil de los alimentos lo que sería beneficioso para productos de agroexportación.

Por lo tanto, este trabajo de investigación se enfoca en la elaboración y evaluación de películas a base de alginato como matriz polimérica, cargados con extractos de macroalgas pardas como agente bioactivo y reticulados con una solución de calcio; de esta manera, se desea aprovechar al máximo las macroalgas pardas a fin de obtener distintos compuestos y aportar en el desarrollo de nuevas películas bioactivas (acción antioxidante). Asimismo, la elaboración de películas como sustituyentes de los empaques alimenticios de plástico, colabora con la disminución de la contaminación ambiental.

5. HIPÓTESIS

El desarrollo de películas y/o recubrimientos a base biopolímeros representan una alternativa ecológica que permiten la protección de alimentos como frutas y verduras frente al ataque de microorganismos, daños externos, así como evitar afectar las propiedades organolépticas del alimento, entre otros; esto debido a las diferentes propiedades mecánicas y de barrera de las películas y/o recubrimientos (Fernández Valdés et al., 2015). En adición, la incorporación de agentes activos (naturales o sintéticos) a la formulación de las películas y/o recubrimientos pueden otorgar características antioxidantes, antimicrobiana, entre otros (De Ancos et al., 2015; Parreidt et al., 2018). Por lo tanto, la elaboración de películas a base de alginato cargado con extractos polifenólicos, ambos extraídos de las macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*, revelará en las películas un carácter antioxidante, así como también se podrían mejorar las características y/o propiedades de las películas; a su vez, al emplearse como empaques de frutos climatéricos como la palta Hass podría prolongar el tiempo de vida útil del fruto.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Elaboración y evaluación de películas con actividad antioxidante diseñadas a partir del alginato de sodio y extractos polifenólicos obtenidos de las macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*.

6.2. Objetivos Específicos

- Extraer alginato de sodio a partir de las especies de macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata* provenientes del distrito de Paracas, provincia de Pisco, departamento de Ica – Perú.
- Caracterizar el alginato de sodio extraído de las dos especies de macroalgas pardas mediante su análisis por FTIR, TGA, DRX, RMN¹H, RMN¹³C y viscosimetría capilar para la determinación de la masa molar promedio.
- Obtener los extractos polifenólicos de las macroalgas pardas y evaluar el medio de extracción.
- Determinar el Contenido Fenólico Total (CFT) de los extractos de las dos especies de macroalgas pardas mediante el método de Folin - Ciocalteu.
- Determinar la Actividad Antioxidante de los extractos de las dos especies de macroalgas pardas mediante el método de radical libre de DPPH.
- Elaborar películas bioactivas a base del alginato cargados con los extractos obtenidos de las dos especies de macroalgas pardas.
- Caracterizar las películas bioactivas mediante su análisis por FTIR, TGA, DRX, opacidad, FESEM y sus propiedades físicas (espesor, humedad y solubilidad).
- Determinar la actividad antioxidante de las películas bioactivas.
- Realizar un análisis preliminar de las películas bioactivas en paltas Hass.

CAPÍTULO II.

FUNDAMENTO TEÓRICO

A. CONCEPTOS PREVIOS

1. Macroalgas o Algas marinas

Las macroalgas o algas marinas son organismos macroscópicos que pueden sobrepasar en algunos casos los 60 metros, existen gran variedad de especies debido a su diversidad morfológica y entre sus características son capaces de generar su propio alimento a partir de su entorno por lo que son considerados como organismos autótrofos y fototróficos, es de ahí, su importancia para el ecosistema marino debido a que son los responsables de absorber dióxido de carbono (CO_2) para la producción del oxígeno (O_2) mediante la fotosíntesis (Mansilla & Alveal, 2004). Asimismo, acorde al color de su talo se clasifican como algas verdes (Clorophyta), algas rojas (Rhodophyta) y algas pardas (Ochrophyta - Phaeophyceae). En todos los casos, las algas marinas acumulan dentro de sus paredes internas distintos tipos y cantidades de compuestos, tales como el alginato, la celulosa, el almidón entre otros polisacáridos de diferentes pesos moleculares. Debido a su exposición en el mar han desarrollado mecanismos de defensa para subsistir frente a bacterias, virus u hongos lo que les permitió desarrollar una variedad de metabolitos secundarios, asimismo a adecuarse a condiciones adversas como cambios drásticos de temperatura, salinidad y contaminantes (Leandro et al., 2020). La diversidad de compuestos polifenólicos presentes en las algas marinas les otorga propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas (Ríos et al., 2009) entre otros, por lo que son objetos de estudio para la extracción de estos compuestos o como uso en suplementos alimenticios debido a su alto contenido de vitaminas, proteínas, fibra dietética, minerales y aminoácidos (Quitral R. et al., 2012), idóneos para el consumo humano, para el cuidado de animales en la ganadería, para el enriquecimiento de cultivos en la agricultura (McHugh, 1987) y para la acuicultura marina (Peso-Echarri et al., 2012).

1.1. Clasificación de las Algas Marinas

1.1.1. Algas Verdes o Chlorophytas

Las algas verdes presentan una coloración entre amarillo verdusco o verde oscuro, proliferan mayormente en ambientes de agua dulce y en algunos casos en aguas tropicales, son poco sensibles a la luz, se sitúan a menos profundidad y tienen menos presencia que las algas rojas y pardas (Quitral R. et al., 2012). Contienen pigmentos como xantofila (luteína y violaxantina), clorofila A y clorofila B, ácidos grasos (ácido linoleico, palmítico, oleico y α -linolénico), carotenoides y el polisacárido ulvan. La especie más conocida es la *Ulva Lactuca* o lechuga de mar y *Chaetomorpha* (Leandro et al., 2020; Quitral R. et al., 2012).

1.1.2. Algas Rojas o Rhodophytas

Las algas rojas pueden desarrollarse en grandes profundidades por lo que no requieren de mucha luz siendo llamadas especies bentónicas (Mansilla & Alveal, 2004); son causantes del fenómeno de marea roja, el cual se produce por temporada debido a la excesiva proliferación del alga. Presentan pigmentos como ficoeritrina, ficobilinas, clorofila A, clorofila D y carotenoides los cuales son los causantes de dar la coloración rojiza al alga. Contienen además ácidos grasos como el ácido palmítico, oleico y araquidónico (Leandro et al., 2020; Quitral R. et al., 2012). En su estructura celular, presentan una región interna rígida donde se aloja la celulosa y una región externa mucilagínosa conformada por ficocoloides de galactanos como el agar - agar y carragenanos (Mansilla & Alveal, 2004). Entre las especies comerciales donde se extrae el agar están la *Gracilaria* y *Gelidium*, mientras que la carragenina se extrae principalmente de la especie de *Chondrus crispus* (McHugh, 1987).

1.1.3. Algas Pardas u Ochrophytas - Phaeophyceae

Las algas pardas preferentemente se ubican en las costas rocosas a profundidad intermedia y son más sensibles a la luz, proliferan también en aguas frías y dulces. Contienen pigmentos como la clorofila A, clorofila C, fucoxantina y flavoxantina (xantofilas) que le brindan unas coloraciones amarilla – parda oscura (Pal et al., 2014), aminoácidos como la fosforina (Quitral R. et al., 2012) y en su organización estructural, el alga parda presenta una capa interna que alberga la celulosa y una capa externa conformada por los ficocoloides de fucoidanos y especialmente del ácido algínico, este último, se puede encontrar en distintas

combinaciones con cationes divalentes como el calcio y magnesio (Mansilla & Alveal, 2004). Entre las especies comerciales de algas pardas se tienen la *Durvillaea antarctica*, *Macrocystis*, *Lessonia*, *Ascophyllum* y *Ecklonia*, de los cuales se extrae esencialmente el alginato en distinta calidad y cantidad (McHugh, 1987; Quiral R. et al., 2012).

1.1.3.1. *Macrocystis pyrifera*

Esta especie pertenece al orden Laminariales, familia Laminariaceae y es conocido comúnmente como sargazo, bolita, canutillo, huiro flotador o giant kelp (en inglés). Morfológicamente presenta un disco de fijación o una base rizoide circular de 40 cm de diámetro y 35 cm de altura que le permite adherirse fuertemente a sustratos rocosos de mediana profundidad, tienen estipes largos, circulares y flexibles de color amarillo – pardo, de los cuales se conectan a aerocistos o bulbos que contienen aire permitiendo la flotabilidad del alga, de estos se extienden las hojas laminares, alargadas y anchas. Estas especies pueden alcanzar grandes tamaños de más de 30 m conformando bosques submarinos extensos. Están distribuidos en la costa de américa del norte (Alaska, Baja California Norte y Sur, Islas Revillagigedo y México), américa del sur (Argentina, Chile y Perú), Sudáfrica y Nueva Zelanda. Entre sus aplicaciones, son fuentes de alimentos, fertilizantes, biocombustible, dermocosméticos, farmacológicos y biomasa para la extracción del alginato (Arakaki et al., 2018; Castro et al., 2016; Guiry & Guiry, 2019; IMARPE, 2023).

1.1.3.2. *Lessonia trabeculata*

Perteneciente al orden Laminariales y familia Lessoniaceae, esta especie es llamado comúnmente como aracanto palo, huiro palo, huiro varilla y kelp (en inglés), y puede alcanzar hasta los 25 a 30 m de profundidad, generando bosques frondosos que permiten la coexistencia de distintas especies marinas. En su morfología, presenta un disco de fijación irregular de 20 cm de altura que se adhiere a sustratos rocosos submareales, tienen estipes largos y gruesos de color pardo a café que alberga hojas laminadas, anchas y largas. Están distribuidos a lo largo de la costa del pacífico sudamericano (Chile, costa central y sur del Perú). Es principal fuente de alginato (Arakaki et al., 2018; Carbajal & Gamarra, 2018; Castro et al., 2016; IMARPE, 2023).

En la **Figura 1** se esquematiza la clasificación de las algas marinas y sus compuestos químicos característicos.

Figura 1

Clasificación de las algas marinas: Algas Verdes, Algas Rojas y Algas Pardas.



1.2. Compuestos Bioactivos de las Algas Marinas

Los compuestos bioactivos son aquellos que cumplen funciones beneficiosas influyendo en las actividades fisiológicas y celulares de un organismo. En el caso de las algas marinas, al estar expuestas a un entorno ambiental fluctuante genera en estas la producción de una variedad de metabolitos secundarios o compuestos únicos que permiten combatir el estrés oxidativo en el que se encuentran (Consuegra, 2014). Estos metabolitos y/o compuestos ejercen acción antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antidiabética, antimicrobiana, protección contra la radiación UV, entre otros (Leandro et al., 2020; Mateos et al., 2020; Pangestuti et al., 2018; Thomas & Kim, 2011); por ello, la importancia en el estudio y uso de las algas marinas. Entre los tres tipos de algas marinas, estudios evidencian que las algas pardas poseen mayor contenido de polifenoles (Quiral R. et al., 2012).

En general, las algas marinas albergan una amplia variedad de compuestos bioactivos, entre estos se han detectado ácidos grasos, péptidos, carotenoides, polifenoles, polisacáridos entre otros (Consuegra, 2014; Hermund, 2018).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios conformado por un hidrocarburo aromático enlazado con uno o más grupos hidroxilos; abarcan desde moléculas simples como ácidos fenólicos hasta complejas como florotaninos, siendo estos compuestos exclusivos de las algas pardas (Mekinić et al., 2019; Santos et al., 2019).

Los carotenoides son moléculas lipofílicas con una estructura base de 40 carbonos en sistemas de dobles enlaces conjugados, siendo esta secuencia de enlaces lo que influye en sus propiedades de absorción de la luz (acción fotoprotectora o contra procesos foto-oxidativos) y en su acción antioxidante; se dividen en carotenos (compuestos por átomos de H y C) y xantofilas (conformados por átomos de H, C y O) como la fucoxantina (Gómez-Carrasco et al., 2021; Hermund, 2018).

Los polisacáridos sulfatados son otros compuestos principales que contienen las algas marinas, se caracterizan por tener acciones inmunoinflamatorias, actividades anticoagulantes y antivirales, idóneos para la industria farmacéutica y alimenticia. Acorde al tipo de alga se tienen como polisacáridos a las carrageninas en las algas rojas, ulvanos en las algas verdes y fucoidanos en las algas pardas. En el caso de los fucoidanos, estudios indican que presenta acción antitumoral debido a que inhibe la proliferación de células tumorales y mejora el sistema inmunológico (Hermund, 2018; Qin, 2018).

2. Florotaninos

Los florotaninos son oligómeros o polímeros que se producen de la polimerización de los monómeros de floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) formado por medio de la vía de policétidos o ruta acetato-malonato (Martínez & Castañeda, 2013).

Los florotaninos son los metabolitos polifenólicos exclusivos de las algas marinas contemplándose una mayor concentración en las algas pardas que en las algas verdes y rojas (Santos et al., 2019). Dependiendo de la especie del alga, la estación de recolección y el entorno en que las algas se desarrollan, estos compuestos químicos constituyen entre el 2 % hasta el 20 – 30 % del peso seco del alga (Mekinić et al., 2019; Singh & Sidana, 2013).

Entre las características de los florotaninos son que tienen una diversidad de tamaño y peso molecular desde los 126 a 650 KDa (Hermund, 2018); son altamente hidrofílicos y debido a que en su estructura se tienen muchos grupos hidroxilos, estos permiten una absorción más fácil de los florotaninos en el sistema biológico (Ford et al., 2019).

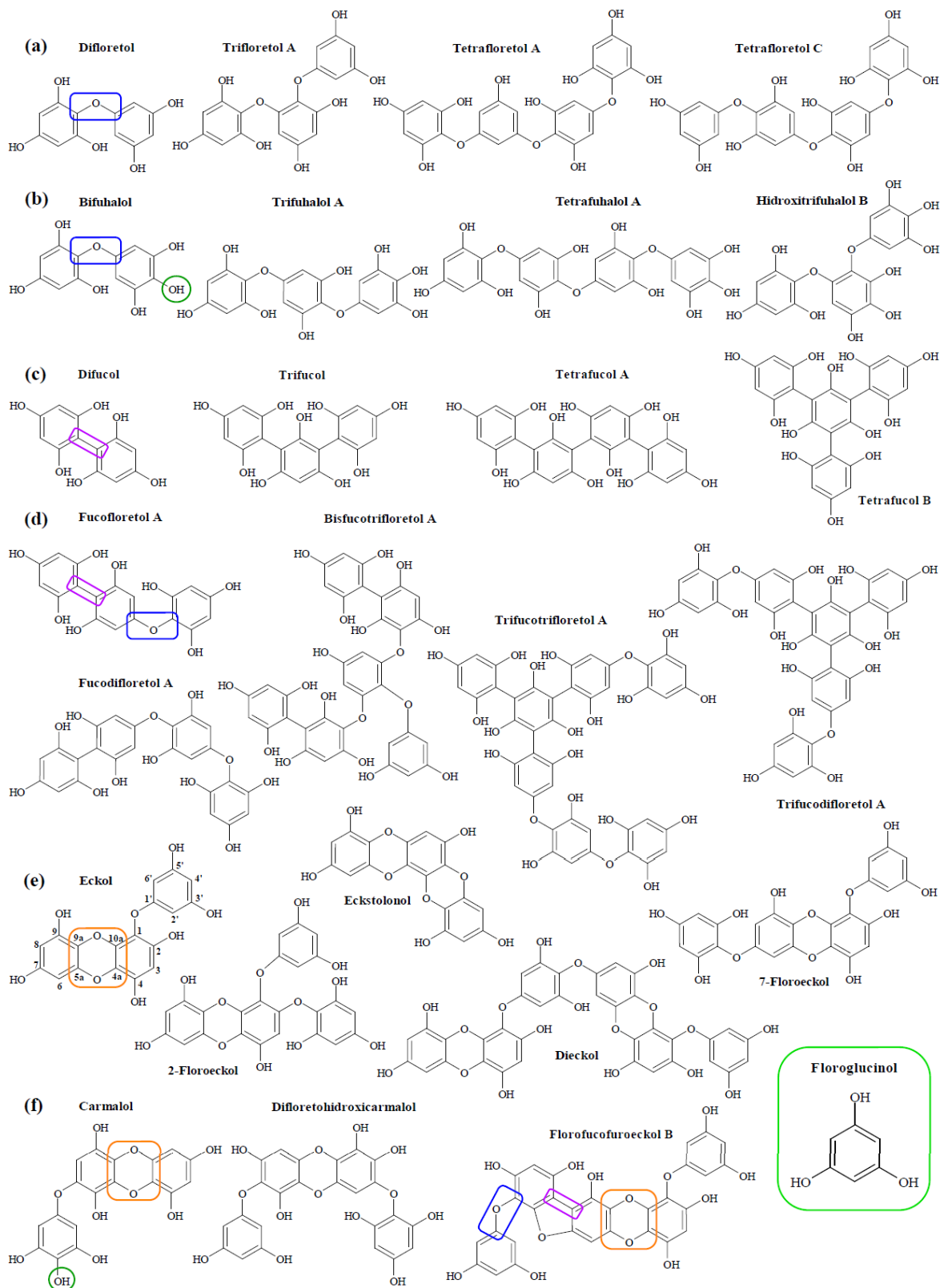
Con relación a sus propiedades o actividades biológicas, algunos estudios han reportado que los florotaninos son beneficiosos debido a que presentan actividad antimicrobiana, antibacteriana (Eom et al., 2012; Qin, 2018), antioxidante, antiinflamatoria (Singh & Sidana, 2013), anticancerígeno, antidiabético, anti-VIH (Thomas & Kim, 2011) y acción fotoprotectora (Catarino et al., 2017; Singh & Sidana, 2013).

Los florotaninos se clasifican en seis tipos, según la naturaleza del enlace de las unidades de floroglucinol (**Figura 2**), el número y la distribución de grupos hidroxilos, se tienen los floretoles, fuhaloles, fucos, fucofloretos, eckoles y carmaloles (Gisbert et al., 2022; Singh & Bharate, 2006). Los floretosles presentan enlace éter (C-O-C) entre los monómeros de floroglucinol orientados en posición orto, meta, para y/o sus combinaciones como el difloretol, trifloretol A, tetrafloretol A y tetrafloretol C (**Figura 2.a**), en los fuhaloles el puente éter entre los monómeros se da en posición para y orto con la adición de un grupo hidroxilo en uno de los anillos (Martínez & Castañeda, 2013) como en el bifuhalol, hidroxitritufuhalol B, trifuhalol A y tetrafuhalol A (**Figura 2.b**). Los fucos presentan enlace arilo o fenilo (C-C) entre sus monómeros como por ejemplo el difucol, trifucol, tetrafucol A y tetrafucol B (**Figura 2.c**). Los fucofloretos evidencian las combinaciones de los enlaces éter (C-O-C) y fenilo (C-C) en modo lineal o ramificado como en el fucofloretol A, fucodifloretol A, fucotritfloretol A, fucotritfloretol E, bisfucotritfloretol A, trifucodifloretol A, trifucotritfloretol (**Figura 2.d**). A. Los eckoles presentan sistemas de enlace dibenzodioxina como el eckstolonol, dieckol, 2-floroeckol, 7-floroeckol y 7-hidroxi-eckol (**Figura 2.e**). Los carmaloles contienen unidades o restos de dibenzodioxina con la adición de un grupo hidroxilo en su estructura como el difloretohidroxicarmalol (**Figura 2.f**), son considerados también como derivados de floretosles con restos de dibenzodioxina y tienen mayor peso molecular a comparación de los eckoles. En adición, los florotaninos también pueden comprender distintas combinaciones de las clases mencionadas, tal como el florofucofueckol B y fucofuroeckol B (Catarino et al., 2017, 2021; Gisbert et al., 2022; Martínez & Castañeda, 2013; Singh & Bharate, 2006; Singh & Sidana, 2013). En la **Figura 2** se observan los tipos de florotaninos presentes en las algas marinas.

Figura 2

Floroglucinol y estructuras de las clases de Florotaninos presentes en las algas marinas.

(a) Floretoles, (b) Fuhaloles, (c) Fucoles, (d) Fucofloretoles, (e) Eckoles y (f) Carmalol.



3. Alginato

El alginato es un polisacárido o hidrocoloide que se extrae principalmente de las algas pardas recolectadas de las costas del Atlántico Norte, Asia y América de Sur; representa entre el 10 % y 40 % del peso seco del alga, valor que varía entre especies (Donati & Paoletti, 2009; Imeson, 2009). Las algas pardas empleadas comercialmente para la obtención de alginato son *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea antártica*, *Durvillaea potatorum*, *Eckonia cava*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Lessonia nigrescens*, *Lessonia trabeculata*, *Macrocystis pyrifera*, *Macrocystis antártica*, *Sargassum* y *Turbinaria* (McHugh, 1987). Existen también algunas bacterias con la capacidad de sintetizar de manera extracelular el alginato, estas son las especies *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas* (Peso-Echarri et al., 2012).

El alginato fue descubierto e investigado por primera vez por Stanford en 1881, en donde el término alginato hace referencia a las sales de ácido algínico, siendo estas sales de sodio, magnesio, calcio y potasio (Imeson, 2009; McHugh, 2002).

El alginato actúa como un agente estabilizante y espesante debido a su capacidad de gelificación y de retención de agua; es de ahí su reconocimiento e importancia en los distintos campos de la industria como la farmacéutica, cosmética, textil y alimenticia; asimismo, en el campo de la investigación, existen estudios sobre las posibles aplicaciones del alginato en la medicina y la biotecnología debido a que se pueden realizar modificaciones estructurales permitiendo múltiples usos del material como la elaboración de hidrogeles (Avendaño et al., 2013; Donati & Paoletti, 2009; Hurtado et al., 2020; Imeson, 2009).

3.1. Fuentes de obtención

A partir de las algas marinas es posible extraer gran variedad de polisacáridos, entre los que destacan las carrageninas, galactanos, laminarianas, agares, fucoidanos y alginatos, estos hidrocoloides presentan diferentes características y/o propiedades que son empleados en una amplia gama de aplicaciones; por ende, son de gran importancia e impacto en los comercios e industrias (Ayarza, 2014; J. Oliveira, 2003).

A nivel mundial, las especies de algas pardas más representativas para la obtención del alginato son *Ascophyllum*, *Laminaria* y *Macrocystis* (McHugh, 1987).

A nivel nacional, el litoral peruano alberga distintas especies de algas marinas, principalmente en las zonas centro y sur se comercializan las especies de *Macrocystis integrifolia*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia nigrescens* y *Lessonia trabeculata*, los cuales son recolectados de forma pasiva (material varado en las orillas) y activa (extraído del mar por embarcaciones e indumentarias como cuchillas y espátulas). Acorde a un estudio sobre las condiciones de viabilidad ecológica de las especies citadas, indican que la forma de crecimiento del alga, las temporadas de recolección (invierno-verano) y los efectos del Niño u otro efecto oceánico afectan en gran medida a su contenido interno (metabolitos y/o polisacáridos) e influyen en el futuro poblacional de las algas (Vásquez et al., 2012). Estos causales inciden también en la exportación del alga y comercialización de sus derivados; asimismo, las propiedades, calidad y contenido del alginato se ve determinada no solo de la especie de alga, las condiciones climáticas de desarrollo (temperatura, salinidad y nutrientes) y la forma de recolección, sino también por las partes del alga (estipes y filoides), la humedad y la metodología de extracción (Donati & Paoletti, 2009; McHugh, 1987).

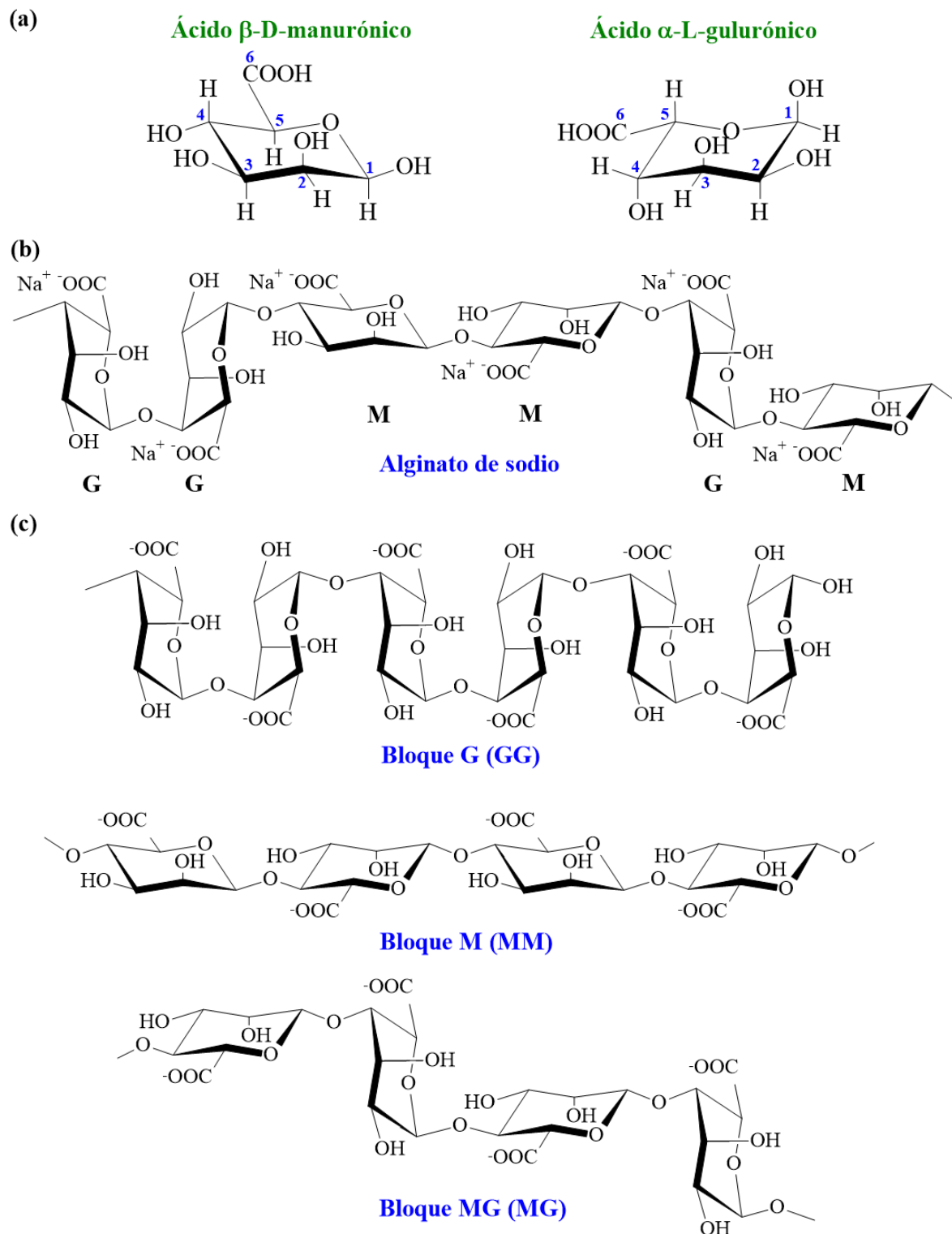
3.2. Composición química

El alginato es un polisacárido lineal, constituido por dos unidades monoméricas de ácidos urónicos; estos son el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G), los cuales se conectan en las posiciones C₁ y C₄ por enlaces glicosídicos (1 $\rightarrow$ 4) y dispuestos a lo largo del polímero de manera homopolimérica, heteropolimérica y/o alternada; es decir, se encuentran distribuidos en forma de bloques o segmentos (Imeson, 2009).

La conformación de la cadena polimérica del alginato no evidencia monómeros repetitivos sino busca estructuras más favorables y estables; por consiguiente, los bloques alternados MG o GM, bloque MM y bloque GG evidencian enlaces glucosídicos diferentes (**Figura 3**). En el bloque GG, la forma silla de los residuos gulurónicos presentan enlaces glucosídicos diaxial α - (1,4) siendo su estructura capsular y rígida; en el bloque MM, los residuos manurónicos se conectan por enlaces glucosídicos diecuatorial β - (1,4) presentando una estructura plana y recta; y en el bloque MG o GM, los residuos urónicos (M y G) tienen enlaces glucosídicos ecuatorial - axial con una estructura escalonada. Considerando estas conformaciones, el volumen y la carga de los grupos carboxílicos, se tienen diferencias en la flexibilidad siendo la tendencia entre los bloques: MG o GM (más flexibles) > MM > GG (menos flexibles) (Donati & Paoletti, 2009; McHugh, 1987).

Figura 3

Estructura química del Alginato. (a) Monómeros constituyentes: ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G); (b) Alginato de Sodio; (c) Secuencia de los bloques: Bloque G, Bloque M y Bloque MG.



La relación de las proporciones de manuronato y guluronato (M/G) en la cadena polimérica varía según la especie de alga y el modo de extracción del polisacárido; asimismo, repercuten en las propiedades del alginato, entre estas, su capacidad gelificante y de resistencia. Si el alginato contiene mayor proporción del residuo manurónico (M) como en el caso del género *Macrocystis spp.*, el gel resultante es flexible, suave y tiene una mayor capacidad de retención de agua; caso contrario, si el residuo gulurónico (G) es de mayor proporción, como en el caso de la especie *Laminaria Hyperborea*, el gel resultante es rígido y con poca capacidad de retención de agua (Ayarza, 2015; J. Oliveira, 2003). En la **Tabla 3** se indican los porcentajes de los residuos M y G presentes en algunas algas pardas.

Tabla 3

Porcentaje del residuo manurónico (M) y gulurónico (G), relación M/G y rendimiento de alginato en distintas especies de macroalgas pardas.

Especie	% M	% G	M/G	% Alginato
<i>Macrocystis pyrifera</i>	50.5 ^a	49.5 ^a	1.02 ^a	20 - 31 ^{b, c}
<i>Macrocystis pyrifera</i>	61 ^d	39 ^d	1.56 ^d	NR
<i>Macrocystis pyrifera</i>	60 ^e	40 ^e	1.50 ^e	26 ^e
<i>Macrocystis pyrifera</i> (hojas)	63 ^f	37 ^f	1.73 ^f	34.9 ^f
<i>Lessonia trabeculata</i>	30 ^g	70 ^g	0.43 ^g	25.67 ^g
<i>Lessonia nigrescens</i>	60 ^e	40 ^e	1.50 ^e	35 ^e , 28 - 41 ^b
<i>Ascophyllum nodosum</i>	65 ^e	35 ^e	1.85 ^e	26 - 28 ^e
<i>Ascophyllum nodosum</i>	46 ^d	54 ^d	0.85 ^d	19 - 30 ^{b, c}
<i>Laminaria digitata</i>	55 ^e	45 ^e	1.20 ^e	20 - 26 ^e
<i>Laminaria digitata</i>	59 ^a	41 ^a	1.43 ^a	18 - 26 ^{b, c}
<i>Laminaria hyperborea</i> (estipe)	30 ^e	70 ^e	0.43 ^e	25 - 75 ^e
<i>Laminaria hyperborea</i> (fronda)	56 ^{a, d}	44 ^{a, d}	1.28 ^{a, d}	25 - 38 ^{b, c}
<i>Laminaria japonica</i>	69.3 ^a	30.7 ^a	2.26 ^a	NR
<i>Laminaria japonica</i>	65 ^{c, d}	35 ^{c, d}	1.86 ^{c, d}	22 - 28 ^{b, c}
<i>Ecklonia máxima</i>	55 ^e	45 ^e	1.20 ^e	30 - 40 ^{b, c}

Nota. NR: No Reportado; Referencias: ^a(McHugh, 1987), ^b(Clare, 1993), ^c(Reyes, 2001), ^d(Saji et al., 2022), ^e(J. Oliveira, 2003), ^f(Ayarza, 2015), ^g(Chandia et al., 2001).

3.3. Usos y aplicaciones del alginato

El alginato es un hidrocoloide natural, no tóxico y biodegradable, entre sus productos comerciales se encuentran el alginato de sodio, alginato de calcio, alginato de potasio, ácido algínico, alginato de amonio y alginato de propilenglicol; estos materiales, son inocuos y considerados como aditivo alimenticio, farmacéutico e industrial, aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), reconocidos en el codex de productos químicos de la FAO (Food and Agriculture Organization) y la WHO (World Health Organization) debido en gran parte a su biocompatibilidad con diversos medios y principalmente por su capacidad de gelificación (Avendaño et al., 2013; Imeson, 2009).

El alginato es considerado un agente estabilizante, espesante, gelificante, formador de películas, capaz de retener o conservar agua y dependiendo del tipo de alginato pueden brindar flexibilidad o resistencia mecánica; por consiguiente, el alginato se utiliza en una amplia gama de aplicaciones industriales (Avendaño et al., 2013; Donati & Paoletti, 2009).

En la industria farmacéutica y biomédica, el alginato se emplea en la elaboración de apósitos para heridas, emulsificación de medicamentos, transportación o liberación de fármacos en películas o hidrogeles, formulaciones contra el reflujo gástrico, fabricación de tejido artificial o biomateriales en conjunción con otros polímeros y células e impresiones dentales (prótesis con mejor adhesión) debido a sus propiedades de aglutinamiento, coloidales entre otros (Donati & Paoletti, 2009; Hurtado et al., 2020). En la industria textil, debido a la viscosidad del alginato en solución, es empleado para el estampado textil lo que mejora el brillo y color de los tejidos, también se usa como adhesivo en la industria del papel (McHugh, 1987). En la industria alimenticia varios productos son a base de alginato debido a que aporta textura y viscosidad, tales como las salsas, jarabes, aderezos, mermeladas, cremas para panadería, rellenos de aceitunas y helados, además de conservar las mezclas y emulsiones, retarda la formación de cristales de hielo; también, se emplea en conjunto con proteínas y otros polisacáridos (Hurtado et al., 2020; Imeson, 2009; McHugh, 1987).

El alginato de sodio, debido a su capacidad de retención, es usado para la remoción de metales pesados en el tratamiento de aguas o efluentes industriales; también, es considerado como agente de intercambio iónico debido a su facilidad para formar geles en presencia de metales divalentes (Funami et al., 2009; J. Oliveira, 2003).

3.4. Propiedades del alginato

Las propiedades de interacción con iones, viscosidad, solubilidad y gelación del alginato se ven influenciados por varios parámetros como la temperatura, pH del medio, presencia de iones gelificantes, fuerza iónica del medio, concentración y peso molecular del polisacárido (Lupo, 2014; McHugh, 1987).

3.4.1. Solubilidad

La solubilidad del alginato difiere según el tipo, las sales de ácido algínico formado con los cationes de Na^+ , K^+ , NH_4^+ , $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{NH}_4^+$, Mg^{2+} y Fe^{2+} son solubles en agua; mientras que las sales de ácido algínico con los cationes divalente (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{2+}) o trivalentes (Al^{3+} , Fe^{3+}) son insolubles en agua; asimismo, las sales de alginato en disolventes como alcoholes y cetonas son insolubles (McHugh, 1987; J. Oliveira, 2003). Otro factor que interfiere en la disolución del alginato es el tamaño de partícula; partículas grandes requieren mayor tiempo de agitación y las partículas finas requieren mayor velocidad de agitación para evitar la formación de grumos; en ambos casos, la agitación de alto cizallamiento es necesario para tener una mejor dispersión del alginato en solución; en adición, la temperatura y la dureza del agua afectan la velocidad de disolución (Imeson, 2009).

3.4.2. Viscosidad

La viscosidad de las soluciones de alginatos está determinada por la longitud de las cadenas del polisacárido, los cuales al hidratarse generan un incremento en la viscosidad; la temperatura también afecta el comportamiento del alginato, siendo menor la viscosidad cuando se incrementa la temperatura; además, la despolimerización del polisacárido se produce al mantener la temperatura (mayor a 50 °C) por tiempos prolongados (Lupo, 2014). Las concentraciones salinas (cationes monovalentes) generan un aumento de la fuerza iónica ocasionando una leve disminución de la viscosidad; sin embargo, la presencia de cationes divalentes o trivalentes, azúcares y alcoholes produce una reticulación parcial aumentando la viscosidad (Imeson, 2009; Lupo, 2014). La agitación de alto cizallamiento, requerido para homogenizar soluciones de alginato, ocasiona un descenso en la viscosidad debido a que las cadenas poliméricas empiezan a ordenarse en dirección del flujo de agitación (McHugh, 1987). En relación con el pH del medio, la viscosidad es estable a pH entre 5 -10, dado que los grupos carboxílicos de los residuos urónicos (M y G) generan un efecto repulsivo; a pH

< 5 , los grupos carboxílicos libres ($-\text{COO}^-$) comienzan a protonarse disminuyendo la repulsión electrostática y formándose enlaces puente de hidrógeno entre las cadenas poliméricas lo que incrementa la viscosidad; a $\text{pH} < 2$ se obtiene la precipitación del alginato como ácido algínico y a $\text{pH} > 11$ se tiene una pérdida de la viscosidad debido a que se va generando una polimerización lenta (Avendaño et al., 2013; Lupo, 2014). Otros parámetros que influyen en la viscosidad son la concentración y el peso molecular, acorde a la ecuación de Mark - Houwink la viscosidad intrínseca (η) se correlaciona directamente con el peso molecular (Masuelli & Illanes, 2014), por lo que a pesos moleculares grandes la viscosidad es mayor; en adición, el peso molecular depende de las condiciones de extracción por ello en el mercado comercial existen tres tipos de alginato (bajo, medio y alto peso molecular), de esta manera se obtienen soluciones de alginato con diferentes texturas para distintas aplicaciones; asimismo, cuando se trabaja con altas concentraciones de alginato la viscosidad va en aumento. En la industria, el alginato más empleado es de viscosidad media (200 - 400 mPa.s) (Imeson, 2009; McHugh, 1987).

3.4.3. Gelación

La gelación o solidificación es la capacidad del alginato de formar geles y/o películas mediante el intercambio iónico que se genera entre cationes divalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+}) y la sección de los residuos gulurónicos (Bloque G) de la cadena polimérica. Debido a las interacciones electrostáticas de Van Der Waals, el catión de Ca^{2+} puede unir más de dos bloques G formando zonas multicapas (modelo caja de huevo) o redes rígidas y compactas. En el caso de los bloques M y MG, estas no se unen homogéneamente por lo que forman geles de redes débiles y elásticas. Por ende, la capacidad de formar geles y la fuerza del gel depende del número y la longitud del bloque G (Imeson, 2009; Parreidt et al., 2018).

3.4.4. Intercambio iónico

Las cadenas poliméricas del alginato presentan selectividad iónica frente a los cationes divalentes de alcalinotérreos, siendo el orden ascendente de la siguiente manera: $\text{Mg}^{2+} \ll \text{Mn}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+} < \text{Ba}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Pb}^{2+}$. La afinidad iónica depende de la composición del alginato, principalmente de la cantidad de bloque G debido a que el entrecruzamiento intermolecular ocurre entre el catión divalente y las secciones de bloque G, dando como resultados la formación de hidrogeles. La unión del catión con los segmentos

G (bloque G) de dos cadenas poliméricas adyacentes es del tipo quelato debido a la forma geométrica que presentan; es decir, los residuos gulurónicos (bloque G) están enlazados diaxialmente formando unas cavidades en donde encaja perfectamente el catión divalente (**Figura 4.b**); por otro parte, las configuraciones de los enlaces glucosídicos en las secuencias de los bloques M y MG presentan enlaces diecuatoriales y ecuatorial - axial respectivamente, por tal motivo se forman cavidades estrechas que no permiten albergar correctamente los iones divalentes (**Figura 4.c y 4.d**); considerando estas características, la tendencia en la fuerza de enlace de los cationes divalentes frente a los tres segmentos de la cadena polimérica son: Bloque G, $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} \gg Mg^{2+}$; Bloque M, $Ba^{2+} > Sr^{2+} \approx Ca^{2+} \approx Mg^{2+}$ y Bloque MG, $Ba^{2+} \approx Sr^{2+} \approx Ca^{2+} \approx Mg^{2+}$ (Clare, 1993; Donati & Paoletti, 2009).

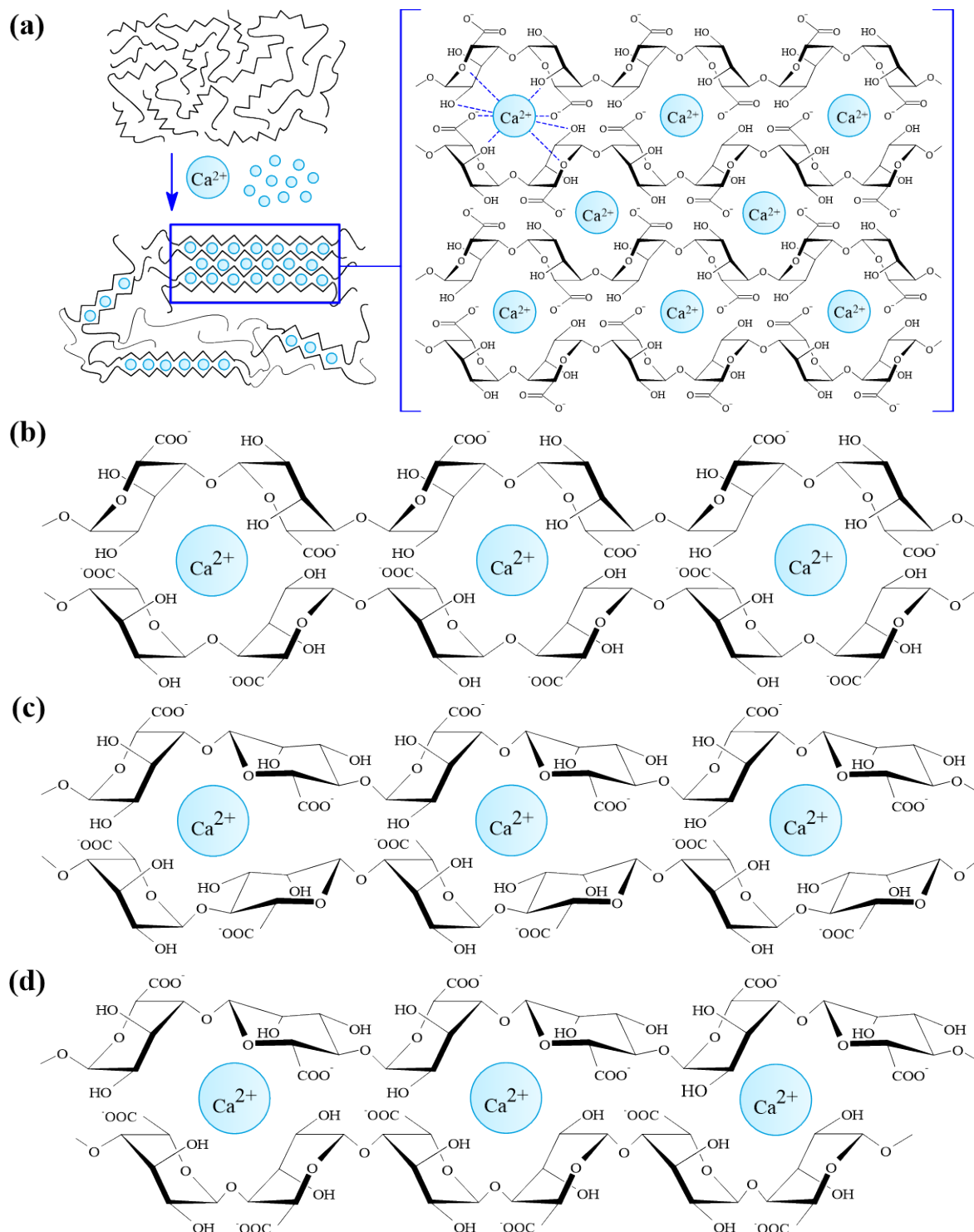
3.4.5. Reticulación con calcio

La reticulación del alginato con calcio se fundamenta en las propiedades de gelación e intercambio iónico de las soluciones de alginato frente a distintos cationes divalentes, en este caso el alginato presenta mayor reactividad con los iones de calcio. El introducir cationes de calcio (Ca^{2+}) al sistema del polisacárido produce un reordenamiento en las cadenas del alginato, lo que conlleva a la formación de hidrogeles o geles, debido a la interacción iónica entre el Ca^{2+} y dos o más segmentos de residuos gulurónicos (G o Bloque G) adyacentes de las cadenas poliméricas; dado que el catión puede encajar en el espacio curvado que forman los Bloques G, el Ca^{2+} puede coordinarse con los átomos de oxígeno de los grupos carboxílicos e hidroxilos del alginato, esta vinculación que produce sistemas tridimensionales para describir la formación del gel es conocido como el modelo de caja de huevo (**Figura 4.a y 4.b**) (Clare, 1993; Helgerud et al., 2009; Parreidt et al., 2018).

Los alginatos con mayor contenido del residuo gulurónico o menor relación M/G generan geles rígidos, densos, quebradizos, baja solubilidad al agua y mejor propiedad de barrera contra la humedad; caso contrario, los alginatos con mayor presencia del residuo malurónico (M o Bloque M) producen geles flexibles, blandos y porosos; así mismo, los alginatos con mayor proporción de bloques MG o GM generan segmentos elásticos en la red del gel (Funami et al., 2009; Imeson, 2009; Paques et al., 2014). Por lo general, las especies de *Macrocystis* y *Ascophyllum* presentan mayor proporción del bloque M mientras la *Laminaria hyperborea* tiene mayor contenido del bloque G (Clare, 1993).

Figura 4

Formación del gel. (a) Reticulación del alginato con los cationes de calcio en las secuencias de los bloques G de la cadena polimérica (modelo de “caja de huevos”); Posibles combinaciones del alginato – Ca^{2+} para la formación de geles: (b) en los Bloques GG-GG; (c) en los Bloques GM-GM y (d) en los Bloques GM-GG.



La reticulación es importante porque influye en las propiedades mecánicas y de barrera del gel, tales como: resistencia a la tracción, capacidad del hinchamiento, permeabilidad al agua entre otros; por ello, es de interés en distintas aplicaciones como la industria alimentaria, la biomedicina por su compatibilidad a distintos componentes celulares (Bidarra et al., 2014; Lee & Mooney, 2012), biomateriales para la liberación y/o encapsulamiento de fármacos (Arias, 2017; Bonilla-Valladares, 2016; Kuo & Ma, 2001).

La reticulación química y/o física dependen del tipo de reticulación, las características del alginato (fuente, concentración, grado de polimerización, composición química, peso molecular), el agente reticulante (sales de calcio) y los agentes moduladores o secuestrantes (Lee & Mooney, 2012; McHugh, 1987; Phillips & Williams, 2009).

Existen distintos métodos para generar la reticulación del alginato con calcio, obteniéndose geles homogéneos o heterogéneos con distintas propiedades. Los más conocidos son la reticulación externa o de difusión y la reticulación interna o in situ.

3.4.5.1.Reticulación externa

El agente reticulante iónico es el catión de calcio (Ca^{2+}) que se difunde al interior de una solución de alginato a fin de formar geles, la interacción es instantánea e irreversible, debido a la alta solubilidad de la sal de calcio (CaCl_2), el Ca^{2+} interactúa fácilmente con las cadenas poliméricas del alginato (Parreidt et al., 2018). Al ser una reacción instantánea, la cinética de reticulación o gelificación es muy rápida, no hay un control del proceso lo que produce geles no uniformes o sistemas heterogéneos (Clare, 1993). Las fuentes de calcio para la reticulación son el cloruro de calcio, lactato de calcio, nitrato de calcio, entre otros, siendo el CaCl_2 la sal más común y que forma geles más fuertes debido a su alta solubilidad; sin embargo, en los alimentos puede brindar un sabor amargo (Lupo, 2014; Parreidt et al., 2018). También, la adición de iones no gelificantes (NaCl) puede reducir la difusión del Ca^{2+} , producir una desestabilización y un hinchamiento del gel (Donati & Paoletti, 2009).

3.4.5.2.Reticulación interna

En la reticulación interna o in situ se tiene un control de la cinética de reticulación debido a la liberación controlada del reticulante (Ca^{2+}). En el sistema alginato - calcio, el Ca^{2+} se libera desde una fuente de sal de calcio inactivo al acidificar el medio mediante la

adición de ácidos orgánicos o lactonas de lenta hidrólisis (Phillips & Williams, 2009). Al ser un proceso de lenta velocidad de reticulación se obtienen geles homogéneos. Como fuentes de sal de calcio inactivo se emplean el sulfato o carbonato de calcio, los cuales tienen baja solubilidad en soluciones acuosas y alta solubilidad en medios ácidos (Bidarra et al., 2014). En el caso de los acidificantes se utilizan el ácido acético o la glucona-delta-lactona (GDL) (Kuo & Ma, 2001). Otros agentes que permiten retardar el flujo de la reticulación son los moduladores o secuestrantes como el citrato, EDTA o fosfato, los cuales compiten con los grupos carboxílicos del alginato para su interacción con el catión (Ca^{2+}) (Lee & Mooney, 2012; McHugh, 1987). En adición, si se aumenta la homogeneidad del sistema se mejoran las propiedades del gel (Bidarra et al., 2014; Kuo & Ma, 2001).

Un análisis del comportamiento de reticulación (modo interno) entre diferentes proporciones M/G del alginato frente a distintas dosis del CaCO_3 y GDL, corroboraron la existencia de segmentos predominantes (Bloques G); en donde, las muestras enriquecidas en G tienen mejor ensamblaje y elasticidad a 15 mM de CaCO_3 , mientras que los ricos en M tenían mejor elasticidad a 3,75 mM de CaCO_3 , asimismo una dosis de 7,5 mM de CaCO_3 mostraba en ambas muestras un mismo comportamiento cinético (Funami et al., 2009).

Otros modos de reticulación que producen diferencias en las propiedades del gel son el modo térmico (a bajas temperaturas se puede reducir la reactividad del reticulante y cambiar las propiedades del gel), covalente (reticulación con polietilenglicoles de diferente peso molecular genera diversas propiedades al gel), celular (modificación del alginato con ligandos celulares para formar geles) entre otros (Bidarra et al., 2014; Lee & Mooney, 2012).

3.5. Metodologías de extracción

Existen diversos procesos para la extracción del alginato a partir de las algas marinas que se fundamentan en una serie de reacciones de intercambio iónico, a fin de optimizar el proceso y obtener alginatos con distintas funcionalidades. En general, los procesos son: acidificación, decoloración, extracción alcalina, separación de la biomasa y precipitación del alginato; en algunos casos se complementa con un tratamiento ácido-base (Fertah et al., 2014; Gomez et al., 2009; Latifi et al., 2015). En adición, la extracción del alginato debe considerar distintos parámetros como la especie del alga, molienda, relación reactivos-alga, solventes entre otros, de esta manera se busca un mejor rendimiento y calidad del alginato.

El tamaño del alga molida influye en el rendimiento de extracción del alginato debido a que se tiene una mayor área superficial de contacto entre el alga y la solución alcalina. En la *Laminaria digitata* se estudiaron tamaños de molienda entre 1 mm a 5 mm reportando un mayor rendimiento al trabajar a 1 mm (Fertah et al., 2014). Si bien las partículas pequeñas del alga ofrecen una mejor interacción con el álcali, también generan cierta dificultad el separar el alginato de sodio soluble de la biomasa (alga residual) por lo que en algunos casos se requieren equipos especiales de separación para evitar pérdidas e impurezas. La humedad del alga también influye en el proceso de extracción ya que tiene como finalidad que los reactivos puedan ingresar plenamente en el alga (Łabowska et al., 2019). Otra forma de tratar la biomasa es mediante la extracción alcalina asistida previamente por microondas, en este caso se induce a la ruptura de las paredes celulares del alga para obtener una rápida liberación del alginato de sodio, mejorando el rendimiento (Nesic et al., 2023).

Entre los pretratamientos convencionales para la extracción del alginato de sodio se consideran en ocasiones el uso independiente o combinado de agentes desengrasantes (éter de petróleo y n-hexano) o decolorante (formaldehído), acidificantes (como el HCl, H₂SO₄ y ácido cítrico) y/o blanqueadores (NaOCl); de igual manera, algunos de estos agentes son empleados en la etapa de purificación. El tratamiento con éter de petróleo o hexano permite remover lípidos, pigmentos o compuestos lipofílicos (Leal et al., 2008; Leyton et al., 2016). El uso del formaldehído permite ablandar y despigmentar debido a que se produce una polimerización entre el formaldehído y los compuestos fenólicos causantes de la coloración característica del alga (Fertah et al., 2014; Hernández-Carmona et al., 2012). En algunos casos se emplea etanol a distinta concentración para eliminar también ácidos grasos, lípidos, pigmentos y polifenoles (Leal et al., 2008; Olate-Gallegos et al., 2019). Otra forma de tratamiento es la acidificación con HCl o H₂SO₄ (pH 4) con el objetivo de remover las sales externas, formaldehído residual, trazas de ácidos fenólicos, polisacáridos (como fucoidanos y laminarinas) y transformar las sales de alginato a ácido algínico siendo más sencilla la extracción con álcali (Bouissil et al., 2020; Latifi et al., 2015; Lorbeer et al., 2015). A fin de evitar el uso de formaldehído, ser más amigable al medio ambiente y lograr la acidificación también es factible el empleo de ácido cítrico (Silva et al., 2023). El uso de agentes blanqueadores como el NaOCl al inicio del proceso de extracción influye en el rendimiento y en la calidad, se obtiene un alginato blanco; sin embargo, existe una degradación en la cadena polimérica que se evidencia en un bajo peso molecular, asimismo una disminución

en la relación M:G debido a que los enlaces glucosídicos de los bloques MM y MG son más sensibles a la hidrólisis que en el bloque GG; por ello, existirá mayor contenido gulurónico (G) que en presencia de iones de calcio pueden generar geles fuertes y resistentes. En adición, el NaOCl también puede ser empleado en la etapa de purificación para blanquear solo el alginato de sodio; de esta manera, se evita el deterioro del alga; sin embargo, el rendimiento de extracción será menor (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010).

En la etapa de extracción se trabaja en un medio alcalino con el objetivo de convertir las sales de alginato insoluble a alginato de sodio soluble mediante un intercambio iónico. En esta etapa es fundamental optimizar la temperatura, la concentración y cantidad del álcali, la agitación, el pH y el tiempo de extracción. La temperatura de extracción puede variar desde la temperatura ambiente hasta los 90°C, al ser un proceso térmico se debe considerar la especie y las partes (estipe, filoide) del alga; asimismo, el tiempo de extracción y la agitación dependen del alga. Condiciones extremas como una alta temperatura y un tiempo de extracción prolongado provocan una reducción en la viscosidad del alginato debido a la despolimerización o rupturas en las cadenas de los residuos urónicos (McHugh, 1987). Algunas especies son más viscosas por lo que es necesario adicionar más líquido en la extracción de esta manera se obtiene una agitación más homogénea; asimismo, considerando las partes del alga en algunos casos los estipes presentan una contextura más rígida por lo que se debe trabajar con altas velocidades de agitación en agitadores de tres aspas o agitadores de propela (Hernández-Carmona et al., 2012). El pH del medio que otorga el álcali es fundamental para la transformación a alginato soluble en agua; por ello, la concentración y la cantidad del álcali son importantes. En general, el carbonato de sodio (álcali) puede fluctuar entre 0.5 a 5% dependiendo del alga y es requerido monitorear el pH durante el proceso debido a que, por la humedad del alga, el pH tiende a disminuir con el tiempo; además, un exceso de carbonato puede involucrar una despolimerización del alginato y un menor rendimiento (Ayarza, 2015; Łabowska et al., 2019).

En la etapa final existen 3 formas para obtener el alginato de sodio, estas son: la ruta convencional mediante la precipitación con alcohol (etanol, isopropanol) y la purificación del alginato por medio de la ruta del alginato de calcio o la ruta del ácido algínico. En la ruta con alcohol, el lodo o extracto alcalino obtenido es tratado con alcohol, de esta manera se consigue la precipitación del alginato de sodio en forma de fibras debido a que es insoluble en este medio, entre los solventes que se pueden emplear están el etanol (Bouissil et al.,

2020; Nesic et al., 2023; Silva et al., 2023) y el isopropanol (Ayarza, 2015); además, para lograr una correcta precipitación se debe considerar concentraciones del alcohol por encima del 50 %. En algunos casos las fibras del alginato pueden ser lavado con otros solventes como metanol o acetona con el objetivo de remover más impurezas (Fertah et al., 2014). En la ruta del alginato de calcio, el extracto alcalino es tratado con cloruro de calcio, formándose redes o fibras blancas debido al entrecruzamiento iónico de las cadenas del alginato. Este gel es insoluble en agua y puede ser decolorada aún más al añadirse hipoclorito de sodio, seguidamente se adiciona ácido clorhídrico, de esta forma se reemplazan los iones de Ca^{2+} con H^+ obteniéndose el ácido algínico como un gel transparente. El ácido algínico obtenido se neutraliza con una solución alcalina, formándose una pasta viscosa que es tratada con etanol a fin de obtener el alginato de sodio (Gomez et al., 2009; McHugh et al., 2001). En la ruta del ácido algínico se emplea ácido clorhídrico diluido sobre el extracto alcalino, obteniéndose un precipitado gelatinoso (ácido algínico). Este gel puede separarse por centrifugación y ser tratado con una solución alcalina en suspensión con etanol, de este modo se obtiene el alginato de sodio (Hernández Carmona et al., 2002). Acorde a los estudios de estas rutas, el proceso más corto para una purificación es la ruta con alcohol, obteniéndose un mejor rendimiento; sin embargo, es necesario el empleo de otros solventes para remover las impurezas lo que implica costos adicionales. En el caso de la ruta ácida, la cadena polimérica tiende a degradarse más rápido; mientras que, en la ruta del calcio, el peso molecular promedio del alginato es más bajo (Gomez et al., 2009; Łabowska et al., 2019). Dependiendo de la aplicación del alginato, se puede procesar alginato de grado alimenticio, farmacéutico entre otros, para lo cual es necesario el empleo de blanqueadores en la última etapa, siendo estas en la ruta de calcio o ruta ácida (Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010; Chaldun et al., 2023; Permatasari et al., 2022), algunos reportes indican que el blanqueo es mejor en la ruta del calcio debido a que las fibras de alginato de calcio son más resistentes a la degradación a comparación del ácido algínico (ruta ácida) (Łabowska et al., 2019).

En general, las reacciones que ocurren durante el proceso de extracción son:

- Obtención del ácido algínico $\text{Ca}(\text{Alg})_2 + 2 \text{H}^+ \rightarrow 2 \text{HAlg} + \text{Ca}^{2+}$
- Obtención del alginato de sodio $\text{Ca}(\text{Alg})_2 + 2 \text{Na}^+ \rightarrow 2 \text{NaAlg} + \text{Ca}^{2+}$
 $2 \text{HAlg} + \text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow 2 \text{NaAlg} + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

En la **Tabla 4** se presentan los procedimientos de pretratamiento, extracción y purificación del alginato a partir de distintas algas marinas.

Tabla 4

Procesos comparativos para la obtención del alginato a partir de algas marinas.

Referencia	Pre-tratamiento	Extracción	Purificación
(Chaldun et al., 2023)	Alga parda: <i>Sargassum aquifolium</i> ; <i>Sargassum cinereum</i> - Lavado con H ₂ O - HCl 1% (1:30, w/v) - Lavado con H ₂ O - Triturar en licuadora	- Na ₂ CO ₃ 10% (70°C, 1h) - Filtrado (descartar sólido) - Preservar el Lodo (NaAlg) o extracto alcalino	- Blanqueo con NaOCl - Conversión a HAlg con HCl 10% (pH 2) - Neutralizar con NaOH - Precipitado del NaAlg en alcohol isopropílico - Secado a 60°C
(Nesic et al., 2023)	Alga parda: <i>Sargassum sp.</i> - Lavado con H ₂ O - Secado 40°C - Molienda (50 mm) - HCl 0.1 M (200 rpm, 24h)	- Exposición del alga al microondas - Na ₂ CO ₃ 3% (200 rpm, 3h, 90°C) - Preservar el Lodo	- Lodo en EtOH - Centrifugar - Preservar las fibras de NaAlg - Lavado con acetona - Secado
(Silva et al., 2023)	Alga parda: <i>Saccharina latissima</i> ; <i>Laminaria digitata</i> - Lavado con H ₂ O - Secado 40°C - Molienda (1 mm) - Ácido cítrico 4% (200 rpm, 30°C)	- Na ₂ CO ₃ 2% (1:27, w/v; 200 rpm, 24h, 30°C) - Centrifugar (descartar sólido)	- Lodo en EtOH (1:2, v/v) - Filtrado de las fibras de NaAlg - Secado
(Permatasari et al., 2022)	Alga parda: <i>Sargassum aquifolium</i> ; <i>Turbinaria ornata</i> - Lavado, secado al sol y molienda - HCl 1% - Filtrado (descartar líquido)	- Na ₂ CO ₃ 4% (agitar, 2h, 60°C) - Diluir con H ₂ O - Centrifugar (descartar sólido)	- Lodo en NaOCl 12% - Conversión a HAlg con HCl 5% (pH 2) - Neutralizar con NaOH - Precipitado del NaAlg con isopropanol - Centrifugar y liofilizar
(Ayarza, 2015)	Alga parda: <i>Macrocystis pyrifera</i> - Lavado con H ₂ O - Análisis en MeOH 40%, HCl, Formol 0.1% y NaOCl - Lavado con H ₂ O	- Na ₂ CO ₃ (80°C, 2h, agitar) - Diluir con H ₂ O caliente (50°C) - Preservar el lodo	- Precipitado del NaAlg en propanol (1:2; v/v) - Lavado de las fibras con propanol - Filtración al vacío - Secado 50°C
(Latifi et al., 2015)	Alga parda: <i>Sargassum sp.</i> - Lavado con H ₂ O - Secado 45°C Ruta CaCl₂ - CaCl ₂ 2%, 2h - HCHO 40%, 2h Ruta HCl - HCHO 40%, 2h - HCl 0.1 N, 24h Ruta H₂SO₄ - HCHO 40%, 2h - H ₂ SO ₄ 1%, 24h	- La biomasa en cada ruta es lavada con H ₂ O - Na ₂ CO ₃ 3% (pH 11, agitar 48h) - EDTA 0.5 g - Filtrado con tela muselina (descartar sólido) - Preservar el Lodo (NaAlg) o extracto alcalino	- Precipitado del NaAlg (lodo) en EtOH - Centrifugar y separar las fibras - Secado a 60°C

Referencia	Pre-tratamiento	Extracción	Purificación
(Lorbeer et al., 2015)	Alga parda: <i>Ecklonia radiata</i> - Lavado, secado en rejilla y molienda - EtOH (agitar 3h) - Filtrado y secado - HCl - Neutralizar con NaOH 2 M	- Na ₂ CO ₃ 0.2 M (agitar 2h, 45°C) - Diluir con H ₂ O - Centrifugar (descartar sólido) - Preservar el Lodo (NaAlg) o extracto alcalino	- Lodo en EtOH - Reposar 12h, 4°C - Precipitado del NaAlg - Centrifugar las fibras - Lavado de las fibras con EtOH 50% - Secado
(Fertah et al., 2014)	Alga parda: <i>Laminaria digitata</i> - Lavado, secado a sombra y molienda - HCHO 2% - HCl 0.2 M - Lavado y filtrado	- Na ₂ CO ₃ 2% (Agitar, 5 h, 25, 40 y 60 °C) - Centrifugar (descartar sólido) - Preservar el Lodo o extracto alcalino	- Lodo en EtOH - Filtrado de las fibras - Lavado con EtOH - Lavado con MetOH - Lavado con Acetona - Secado al ambiente
(Hernández-Carmona et al., 2012)	Alga parda: <i>Macrocystis pyrifera</i> - Molienda - Hidratación del alga - HCHO 0.1 % - HCl (pH 4) - Lavado con H ₂ O	- Hidratación del alga (1:16.6, w/v) - Calentar a 80 °C - Na ₂ CO ₃ en sólido (Hasta pH 10) - Diluir con H ₂ O - Filtrar (preservar el lodo)	- Precipitación como Ca(Alg) ₂ con CaCl ₂ - Conversión: Ca(Alg) ₂ a HAlg (HCl, pH 2) - Conversión: HAlg a NaAlg con Na ₂ CO ₃ en EtOH - Secado y molienda
(Andriamanantoanina & Rinaudo, 2010)	Alga parda: <i>Sargassum sp.</i> ; <i>Zonaria sp.</i> - NaOCl 2.4% - HCl 0.05 N - Lavado con H ₂ O	- Na ₂ CO ₃ 1 M (pH 11, 60 °C, 2 h) - Centrifugar con membrana porosa (8, 3, 1.2 µm) - Preservar el lodo	- Neutralizar el lodo con HCl 1 N - Precipitado del NaAlg con EtOH 50% - NaCl - Lavado con EtOH - Secado al ambiente
(Gomez et al., 2009)	Alga parda: <i>Macrocystis pyrifera</i> - Lavado - Secado - Molienda - HCl 0.1N (pH 4, agitar 15 min, T _{amb}) - Filtrado (descartar el líquido) - Preservar la biomasa (alga pretratada)	- Na ₂ CO ₃ 1N (pH 11.5, 2h, 60°C) - Relación 1:25 (w/v; Alga seca: Na ₂ CO ₃) - Diluir con H ₂ O - Tierra diatomea - Agitar 15 min, temperatura ambiente - Centrifugar (descartar sólido) - Preservar el lodo o extracto alcalino	- Ruta Etanol - Lodo: EtOH (1:1, v/v) - Soxhlet con EtOH, 100 h - Secado al ambiente
			- Ruta HCl - Conversión del NaAlg a HAlg con HCl 1N (pH 2, agitar, 1h) - Conversión del HAlg a NaAlg con Na ₂ CO ₃ (agitar, 1h) - Precipitado del NaAlg con EtOH (1:1, v/v) - Soxhlet con EtOH, 100 h - Ruta CaCl₂ - Conversión del NaAlg a Ca(Alg) ₂ con CaCl ₂ - Soxhlet con agua, 64 h - Conversión del Ca(Alg) ₂ a HAlg con HCl 1N (pH 2, agitar, 3.5h) - Seguir ruta HCl

Nota. EtOH: etanol, NaAlg: alginato de sodio; HAlg: ácido alginico; Ca(Alg)₂: alginato de calcio.

4. Películas y recubrimientos (Biomateriales) en la industria alimentaria

La diversidad de productos de plástico para embalaje, transporte y almacenaje de distintos alimentos los hacen esenciales para el uso diario; sin embargo, el uso masivo del plástico (PP, PE, PET) genera problemas medioambientales, económicos y daños a la salud debido a que los residuos no se degradan y pueden permanecer por más de 100 años en el medioambiente, afectando todo tipo de vida. Como alternativa ecológica para sustituir los plásticos se encuentran los biomateriales o materiales degradables que se descomponen en agua, metano, dióxido de carbono, biomasa y/o compuestos inorgánicos, reduciendo el impacto ambiental (Ferreira et al., 2016; Suderman et al., 2018). Los biopolímeros son materiales degradables empleados para la elaboración de películas y/o recubrimientos, que se derivan de fuentes naturales como polisacáridos, proteínas y lípidos (Eslami et al., 2023).

En la industria alimentaria, los biomateriales son conocidos como películas y/o recubrimientos comestibles. La diferencia entre una película y un recubrimiento reside en sus características y en su forma de elaboración. Una película es una capa delgada del material polimérico que se obtiene por moldeo (preformado) y se puede manipular a fin de envolver alimentos, mientras que un recubrimiento es un revestimiento superficial de una o más capas formadas directamente en la superficie del alimento mediante una inmersión o aspersión del material polimérico, de esta manera se logra cubrir toda la superficie del alimento (De Ancos et al., 2015; Fernández Valdés et al., 2015; Parreidt et al., 2018).

Las películas y recubrimientos en la industria alimentaria tienen como características y funciones: proteger los alimentos frente a distintas bacterias y microorganismos, no deben ser tóxicos, ni afectar severamente las propiedades organolépticas del alimento, brindar protección a daños por manipulación (mecánica, física o química) (Eslami et al., 2023; Fernández Valdés et al., 2015), reducir los procesos oxidativos como el pardeamiento enzimático y otras reacciones asociadas a la maduración y senescencia del alimento (frutas y verduras climatéricas) por medio de la incorporación de agentes antioxidantes, asimismo extender la vida útil del alimento, de esta manera minimizar las pérdidas postcosecha (De Ancos et al., 2015; Ferreira et al., 2016; Vázquez-Briones & Guerrero-Beltrán, 2013), brindar una barrera semipermeable de solutos, aceites y gases (O_2 , CO_2 , C_2H_4 , compuestos volátiles), evitar la pérdida de agua al regular la tasa de respiración del vapor de agua (De Ancos et al., 2015; Parreidt et al., 2018), portadores o vehículos de aditivos (agentes

bioactivos) en donde se permite proteger al agente bioactivo y posteriormente liberarlo en la interfaz del biomaterial por medio del control de la humedad, temperatura, pH, entre otros parámetros (Arredondo Ochoa, 2012; D. Zhang et al., 2018). En la **Figura 5** se representan las funciones de las películas y recubrimientos.

Figura 5

Funciones de las películas y recubrimientos en la industria alimentaria.



4.1. Composición de los biomateriales

Las películas y recubrimientos son elaborados a partir de materiales naturales o formadores (biopolímeros) como los polisacáridos, lípidos y proteínas, así también sus combinaciones permiten aprovechar las características de cada componente y mejorar sus deficiencias individuales. En adición, el uso de plastificantes mejora la flexibilidad y reduce la rigidez del biomaterial, un componente opcional son los surfactantes que favorecen la dispersión de compuestos hidrófobos en la matriz polimérica, mejora la adhesión y humectabilidad del biomaterial (Fernández Valdés et al., 2015; Parreidt et al., 2018). Asimismo, las películas y recubrimientos pueden albergar aditivos bioactivos naturales o químicos que repotencian la actividad del biomaterial, así como cambiar las propiedades mecánicas, funcionales, organolépticas, entre otros (De Ancos et al., 2015).

En general, los biomateriales están conformados por el biopolímero, el disolvente, el plastificante y los agentes bioactivos (acción antioxidante, antifúngica, etc.) y/o surfactantes.

4.1.1. Polisacáridos

En este grupo se encuentran los compuestos de alto peso molecular, presentes en animales, vegetales y microorganismos, constituidos por unidades repetitivas de monómeros o disacáridos unidos por enlaces glucosídicos, son solubles en agua por ello son llamados hidrocoloides. Estos compuestos presentan buenas propiedades de barrera frente al oxígeno y dióxido de carbono, así como buenas propiedades mecánicas en los biomateriales y de correcta adhesión en las superficies de productos hortofrutícolas; sin embargo, al ser compuestos hidrofílicos evidencian bajas propiedades de barrera contra la humedad (vapor de agua). Por otro lado, son compuestos no tóxicos, de bajo costo y no son grasosos. Entre los polisacáridos que se emplean en los biomateriales están los galactomananos, celulosa, almidón, quitina, quitosano, pectina, carragenina, alginato, pullulan, fucopol y gomas vegetales (Arredondo Ochoa, 2012; Ferreira et al., 2016; Parreidt et al., 2018).

4.1.2. Proteínas

Las proteínas son macromoléculas con cadenas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Muestran barrera frente al oxígeno y dióxido de carbono, brindan estabilidad mecánica y exhiben adherencia a superficies hidrofílicas por lo que son buenas formadoras de películas; sin embargo, son sensibles al cambio de pH y no tienen buena resistencia a la difusión del vapor de agua; por ello, se opta en elaborar películas en combinaciones de compuestos hidrofóbicos a fin de reducir la permeabilidad al agua. Entre las proteínas que se pueden emplear en los biomateriales están la caseína, soya, albúmina, gelatina, colágeno, gluten de trigo, suero de leche, etc. (Arredondo Ochoa, 2012; De Ancos et al., 2015).

4.1.3. Lípidos

Los lípidos son compuestos hidrófobos, no poliméricos porque no contienen muchas unidades repetitivas que formen grandes moléculas. Presentan baja afinidad al agua por lo que exhiben una barrera contra la humedad reduciendo la transpiración y deshidratación del alimento, además mejora la apariencia y el brillo, protege contra la oxidación y reduce el crecimiento microbiano; sin embargo, debido a su naturaleza posee baja cohesión y poca adherencia a superficies hidrofílicas; por ello, son incorporados en matrices de hidrocoloides a fin de mejorar sus características. Entre los lípidos que se pueden emplear están las ceras de abeja, cera carnauba, cera candelilla, resinas y ácidos grasos como el ácido esteárico,

ácido láurico, ácido oleico y ácido palmítico, entre otros (Arredondo Ochoa, 2012; De Ancos et al., 2015; Fernández Valdés et al., 2015; Vázquez-Briones & Guerrero-Beltrán, 2013).

4.1.4. Plastificantes

Los plastificantes son moléculas de bajo peso molecular, baja volatilidad, alta temperatura de ebullición y similares al biopolímero formador de la película o recubrimiento. Debido a las limitaciones de los biopolímeros es necesario incorporar plastificantes con el principal objetivo de otorgar mayor flexibilidad a los biomateriales. Los plastificantes son capaces de reducir los enlaces de hidrógeno interno que ocurre entre las cadenas poliméricas, lo que conlleva al aumento del espacio intermolecular (mayor volumen libre) permitiendo la movilidad de las cadenas poliméricas, de este modo se reduce la fragilidad, se mejora la flexibilidad, homogeneidad y fortalece la estructura de las películas (Abera et al., 2020; Laohakunjit & Noomhorm, 2004; Parreidt et al., 2018; Solano-Doblado et al., 2018; Y. Zhang & Han, 2006), se regula el flujo o tasa de respiración y se minimizan los daños por manipulación del biomaterial (Abera et al., 2020; Cao et al., 2009); por consiguiente, los plastificantes pueden modificar las características y propiedades de las películas y recubrimientos (morfología, propiedades mecánicas, térmicas y físicas) (Mohammed et al., 2023; Suderman et al., 2018). Al tener bajo peso molecular, los plastificantes pueden difundirse más fácil entre las redes poliméricas; sin embargo, pueden migrar a la superficie por distintos factores (cambios de temperatura y entorno, tamaño y forma del plastificante, etc.), la pérdida del plastificante en las películas las vuelven más frágiles o con pobres propiedades mecánicas; por otro lado, altas concentraciones del plastificante implica un aumento en la solubilidad y una deficiencia en sus propiedades de barrera contra la humedad debido a su naturaleza hidrofílica (Eslami et al., 2023; Laohakunjit & Noomhorm, 2004).

Para una mayor efectividad del plastificante se deben considerar la composición química, peso molecular, tamaño y forma del plastificante, compatibilidad entre el plastificante y el biopolímero, concentración, nivel de toxicidad, rentabilidad, polaridad y el mayor número de grupos funcionales (grupo hidroxilo, -OH) por molécula (Cao et al., 2009; Eslami et al., 2023; Laohakunjit & Noomhorm, 2004; Y. Zhang & Han, 2006).

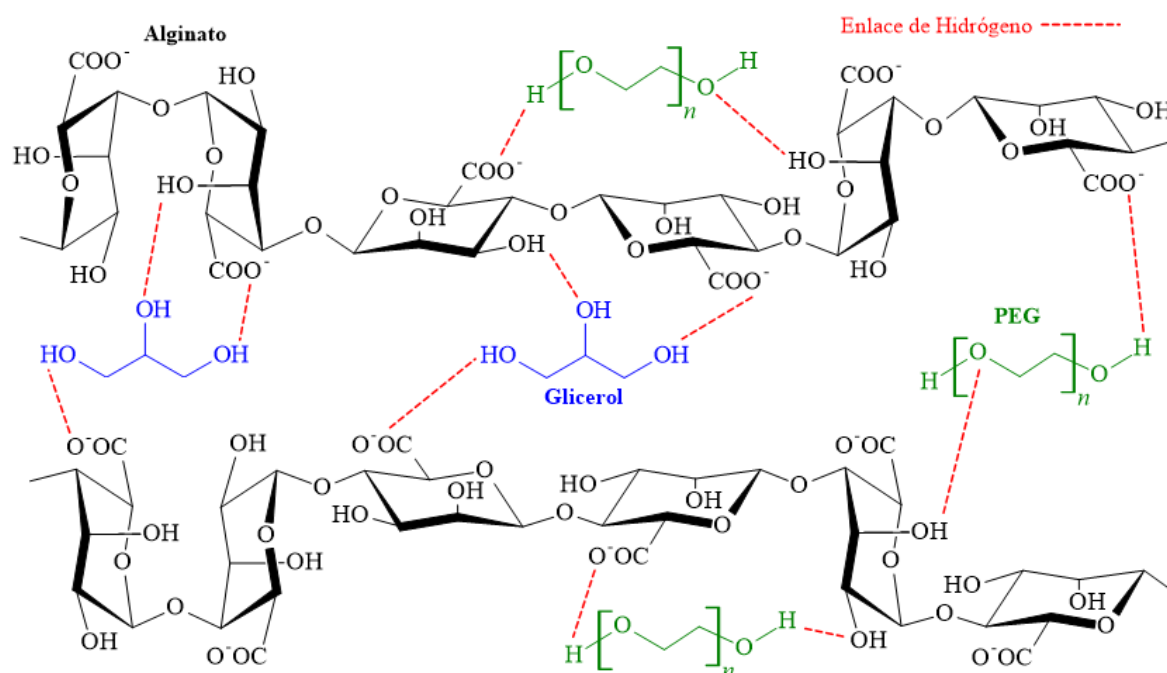
Los fenómenos y mecanismos que ocurren en la plastificación de biopolímeros se pueden describir con la teoría de la lubricidad, la teoría del gel y esencialmente la teoría del

volumen libre. En la teoría de la lubricidad, los plastificantes lubrican el movimiento del biopolímero debido a que reducen la fricción intermolecular entre las cadenas poliméricas, aumentando así la flexibilidad, lo que genera una mayor movilidad o deslizamiento del biopolímero. En la teoría del gel, el plastificante es el responsable de la rigidez del biopolímero debido a que reduce los puntos de contacto entre las cadenas permitiendo deformar al biopolímero sin romperse. En la teoría del volumen libre, los plastificantes reducen las fuerzas intermoleculares del biopolímero generando un espacio interno y movilidad entre las cadenas poliméricas, de este modo se mejora la flexibilidad. El volumen libre en el biopolímero se puede generar por los movimientos de la cadena principal, lateral y extremos; en adición, otra manera de incrementar el espacio interno del biopolímero es al elevar la temperatura (Eslami et al., 2023).

La **Figura 6** esquematiza el efecto del glicerol y polietilenglicol (PEG) sobre las cadenas del alginato, en donde el glicerol y el PEG poseen 3 y 2 grupos funcionales (-OH) respectivamente, aumentan el volumen libre, reducen las interacciones intermoleculares y crean nuevos enlaces con las cadenas poliméricas, volviendo más flexible al biopolímero.

Figura 6

Interacción de los plastificantes de glicerol y polietilenglicol (PEG) sobre las cadenas poliméricas del alginato.



Entre los plastificantes que se emplean para la elaboración de biomateriales están los glicoles, ácidos grasos, azúcares y polioles como el glicerol, sorbitol y polietilenglicol, entre otros; asimismo, se pueden emplear mezclas de plastificantes para mejorar las propiedades de las películas al aprovechar las cualidades de cada plastificante (Abera et al., 2020).

4.1.4.1.Glicerol

Compuesto hidrofílico de bajo peso molecular que posee 3 grupos funcionales (-OH) que le permiten interactuar con las cadenas poliméricas. Aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para añadirse a películas y recubrimientos, empleado también en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica. El glicerol brinda una mayor flexibilidad y mejora las propiedades mecánicas, a concentraciones adecuadas aumenta el porcentaje de alargamiento y reduce la resistencia a la tracción del biomaterial; sin embargo, debido a su naturaleza hidrofílica genera deficiencia en las propiedades de barrera frente al vapor de agua (Eslami et al., 2023; Laohakunjit & Noomhorm, 2004; Tarique et al., 2021).

4.1.4.2.Polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol posee dos grupos funcionales para interactuar con el biopolímero, presenta diversos pesos moleculares entre 300 a 4 000 g mol⁻¹ e influye en las propiedades mecánicas, térmicas y de barrera de las películas y posee. Los PEG con peso molecular inferior a 800 g mol⁻¹ son transparentes y viscosos, otorgan a las películas una mejor apariencia, son más elásticas, resistentes que otros plastificantes y manifiestan una mayor resistencia a la humedad (reducción a la permeabilidad del vapor de agua); mientras que los PEG con peso molecular superior a 800 g mol⁻¹ están en estado sólido como escamas blancas y muestran mayor dificultad para difundirse entre las redes poliméricas por lo que tienden a exhibir películas opacas y aumentan la permeabilidad al vapor de agua. En adición, altas concentraciones del PEG, entre 2 - 6 % según el peso molecular, también genera películas opacas, los cuales con el transcurso del tiempo se manifestaran como películas blancas, quebradizas y en algunos casos aceitosas debido a la migración del plastificante a la superficie de las películas, denominado como efecto “blooming” y “blushing” (floreCIMIENTO y sonroJamiento); es decir, ocurre una separación de fases ocasionado por sobrepasar el límite de compatibilidad entre el biopolímero y el PEG (Cao et al., 2009; Eslami et al., 2023; Maulana et al., 2021; Yacob et al., 2021).

4.1.5. Surfactantes o tensioactivos

Los surfactantes o tensioactivos permiten la dispersión de compuestos hidrófobos en la matriz polimérica al reducir la acción superficial del agua, mejora la humectabilidad y adhesión de los recubrimientos sobre superficies rugosas e hidrófobas y reduce la pérdida de humedad del producto. Se clasifican según su estructura y carga en tensioactivos catiónicos (carga positiva), aniónico (carga negativa), no iónicos (sin carga) y anfóteros (la carga depende del pH). Entre los tensioactivos más comunes empleados en las industrias están los polisorbatos (tween 40 y tween 80), span 60, span 80, lecitina de soja, entre otros (Fernández Valdés et al., 2015; Parreidt et al., 2018).

4.1.6. Aditivos o Agentes bioactivos

La calidad de un alimento se determina por su estado y propiedades, en ese sentido la búsqueda de agentes naturales o químicos que permitan proteger y mejorar la calidad del alimento ha llevado al surgimiento de los agentes bioactivos, los cuales al incorporarse en películas y recubrimientos como aditivos permiten ejercer una acción prologada por ser liberados gradualmente a comparación de su aplicación directa en el alimento; asimismo, los agentes bioactivos no solo influyen en el alimento sino que también modifican las propiedades mecánicas y de barrera de los biomateriales, por ello el interés de su estudio en relación a su interacción y funcionalidad con los biopolímeros y los alimentos. Entre las actividades que se pueden ejercer están la antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, antifúngica entre otros; con relación a ello, el interés está en el empleo de aceites esenciales, principios activos y principalmente en extractos debido a que poseen un alto contenido de polifenoles, los cuales pueden desempeñar más de una actividad. La importancia de añadir agentes antioxidantes a los biomateriales se debe a que pueden brindar protección contra la luz (decoloración), retardar la maduración y senescencia de alimentos climatéricos, así como de otras reacciones causadas por la oxidación (De Ancos et al., 2015; Lupo et al., 2012; Parreidt et al., 2018). Entre los aceites esenciales, principios activos y extractos con actividad antioxidante están el aceite esencial de orégano (dos Santos Caetano et al., 2018), extracto de té verde (Choi et al., 2018), aceite esencial de limón (M. A. Oliveira et al., 2020), ácido protocatecuico (Liu et al., 2017), aceite esencial de canela (T. Xu et al., 2019), aceite de girasol con ascórbico y cítrico que otorgan un enriquecimiento de la vitamina C (Robles-Sánchez et al., 2013), eugenol (Guerreiro et al., 2015); algunos también desempeñan

actividades antibacterianas y antimicrobianas frente a cepas de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella*, entre otros; tales como las nanopartículas de plata (Orsuwan et al., 2016), extractos de nuez (Aloui et al., 2021), de jamaica (Aydin & Zorlu, 2022), de cáscara de granada (Hanani et al., 2019), cinamaldehído (Sipahi et al., 2013); actividad antifúngica frente a *A. alternata*, *C. gloesporioides* al tratar con extracto de moringa (Tsfay et al., 2017); para más compuestos bioactivos en películas y recubrimientos ver la **Tabla 1**.

4.2. Técnicas para la elaboración de películas y recubrimientos

Existen diversas técnicas para la elaboración de películas y recubrimientos, estas pueden ser muy sencillas o complejas, dependiendo de la utilidad o practicidad que se anhele desarrollar tanto en el proceso como en el producto de aplicación.

Entre las técnicas más empleadas para la elaboración de películas y recubrimiento se encuentran:

a. Fundición o eliminación del disolvente: Por medio de la evaporación del disolvente en una estufa se obtiene una capa delgada que se despliega fácilmente del molde, en esta técnica se debe tener cuidado con los secados rápidos y con las altas temperaturas a fin de no alterar la movilidad e interacciones de las cadenas poliméricas, así como evitar perder al plastificante y por consiguiente la flexibilidad de la película (Cagri et al., 2004; Parreidt et al., 2018; Solano-Doblado et al., 2018).

b. Casting: Se realiza la evaporación del disolvente de la solución formadora (contiene al biopolímero, disolvente, plastificante y aditivos activos) a condiciones controladas de temperatura y humedad obteniéndose una película moldeada, esta técnica se considera como un proceso húmedo (Escobar et al., 2009; Solano-Doblado et al., 2018).

c. Extrusión: En base a las propiedades termoplásticas del biopolímero, se trabaja con una solución formadora en la mínima cantidad de agua en un molde o envase, luego se aplica una presión y temperatura a fin de obtener una capa delgada o película. Esta técnica se considera como un proceso seco. En el caso de la coextrusión se sigue el mismo proceso para obtener multicapas; sin embargo, se pueden presentar problemas en las propiedades mecánicas y de barrera (Escobar et al., 2009; Parreidt et al., 2018).

d. Gelación térmica: Se realiza un tratamiento térmico a las películas y recubrimientos a base de proteínas con el propósito de obtener estructuras más compactas y estables debido a la desnaturalización térmica de las proteínas, esta técnica puede involucrar procesos en frío o caliente (Carmona et al., 2007; Solano-Doblado et al., 2018).

e. Pulverización electrodinámica: Por medio de la atomización a un alto potencial eléctrico de la solución formadora se obtienen finas gotas a escala nanométrica, en donde el tamaño puede controlarse por el potencial de incidencia en la boquilla del atomizador (Solano-Doblado et al., 2018).

f. Inmersión: El alimento se sumerge en la solución formadora y luego se drena el exceso a fin de generar una membrana en la superficie del alimento, según se requiera se puede realizar más de una inmersión donde los tiempos varían según el biopolímero, de esta manera se evita la evaporación del solvente y se logra cubrir toda la superficie del alimento; asimismo, en caso de reticular los recubrimientos se hace la inmersión luego de la solución formadora, de este modo se puede reducir la interacción con zonas hidrofílicas (Parreidt et al., 2018; Vázquez-Briones & Guerrero-Beltrán, 2013; D. Zhang et al., 2018).

g. Impregnación al vacío: Se sigue el mismo proceso de inmersión, pero a condiciones controladas en una cámara de vacío, se considera la presión, el tiempo y la atmosfera para el vacío (Parreidt et al., 2018).

h. Pulverización o aspersión: El recubrimiento se produce por la formación de pequeñas gotas en la superficie del alimento mediante la pulverización o aspersión de la solución formadora con boquillas de distintos tamaños. La aspersión se consigue por diferencia de presión y el flujo depende de la boquilla del aspersor, así como la densidad, la viscosidad y la tensión de la solución formadora. Esta técnica permite tratar distintas superficies y controlar el espesor al poder realizar multicapas; sin embargo, puede presentar problemas de obstrucción en la boquilla del aspersor (Parreidt et al., 2018; Vázquez-Briones & Guerrero-Beltrán, 2013).

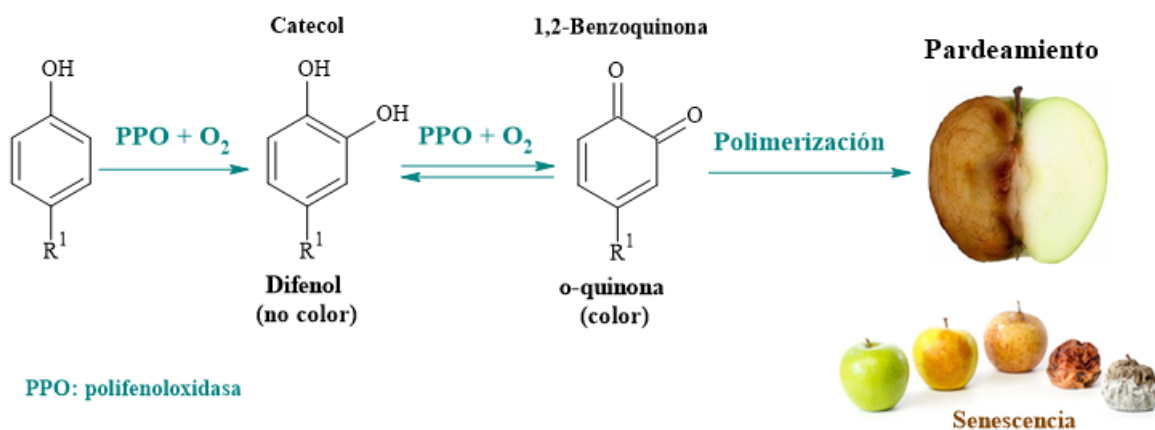
i. Esparcimiento: Por medio de una brocha o pincel se extiende manualmente la solución formadora sobre todo el producto a recubrir, la principal limitante de esta técnica es la falta de uniformidad del recubrimiento (D. Zhang et al., 2018).

5. Pardeamiento Enzimático en Frutas Climatéricas

Las frutas climatéricas después de ser recolectadas siguen su proceso de maduración, parte de estas frutas son destinadas al mercado local y la otra parte de acuerdo con la demanda y sus características a la exportación; sin embargo, la manipulación y los acondicionamientos de almacenaje pueden generar deterioros fisicoquímicos externos e internos que afecten las propiedades organolépticas (sabor, textura, color y olor) y el valor nutricional del alimento, acelerando la senescencia de este. Los daños al tejido de los frutos, que albergan distintos compuestos fenólicos, conllevan a las reacciones de oxidación y/o pardeamiento. El pardeamiento enzimático se produce por la oxidación de los compuestos fenólicos a quinonas que luego se polimerizan formando melaninas que originan el color pardo característico, esta reacción es catalizada por la acción de las polifenoloxidasas (PPO) en presencia de O_2 (**Figura 7**). En adición, el estrés oxidativo también provoca un incremento en la producción de etileno. La velocidad de oxidación depende del contenido de compuestos fenólicos, temperatura, pH y cantidad de O_2 ; en base a ello, si se controla alguno de estos parámetros es posible retardar el proceso oxidativo. Como una alternativa, los antioxidantes pueden ser usados para retardar el pardeamiento debido a que sirven como agentes de sacrificio frente al oxígeno, así como reducir las quinonas a difenoles. Asimismo, la incorporación de agentes antioxidantes en películas y antioxidantes permiten la liberación progresiva de estos agentes a fin de prevenir la oxidación y degradación del alimento, así como crear una barrera frente al oxígeno (Jadán, 2017; Silveira, 2017).

Figura 7

Proceso de pardeamiento enzimático en frutas climatéricas.



B. ASPECTOS QUÍMICOS GENERALES

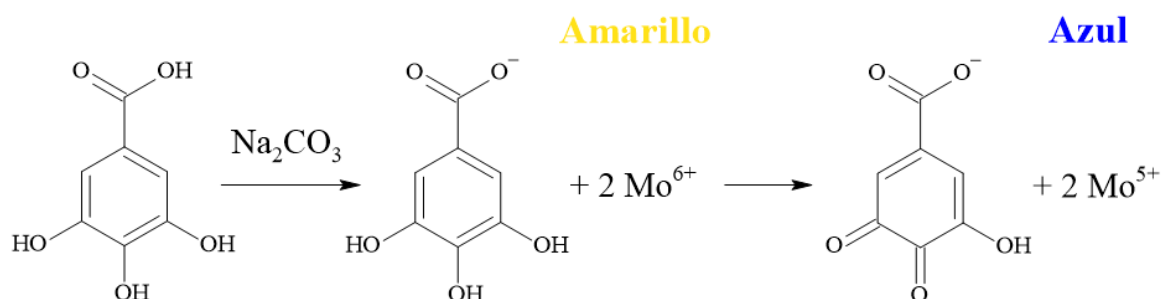
1. Determinación del Contenido Fenólico Total (CFT) por el método de Folin – Ciocalteu

El método de Folin - Ciocalteu se realizó por primera vez para el análisis de tirosina y triptófano (aminoácidos que contienen un grupo fenólico) en proteínas por Otto Folin y Vintila Ciocalteu en 1927 (Folin & Ciocalteu, 1927); actualmente, es el ensayo más empleado para cuantificar compuestos fenólicos totales en extractos naturales, bebidas y alimentos (Christodoulou et al., 2022).

El método de Folin - Ciocalteu determina la capacidad para reducir el reactivo de FC en presencia de compuestos fenólicos. El reactivo de FC contiene una mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico (presencia de iones molibdato y tungsteno) de color amarillo. La **Figura 8** presenta la reacción de óxido - reducción del ensayo, el cual se produce en medio básico (pH 10) a fin de generar el ion fenolato, este ion reduce al reactivo de FC (Mo^{6+} , W^{6+} se reducen a Mo^{5+} , W^{5+}) evidenciándose un cambio en la coloración del complejo de amarillo a azul que absorbe a longitudes de onda alrededor de los 760 a 765 nm (Christodoulou et al., 2022; Fernandez-Burgos, 2017; Muñoz-Bernal et al., 2017).

Figura 8

Reacción de reducción del molibdeno (reactivo de Folin-Ciocalteu) frente al ácido gálico (compuesto fenólico) en medio básico.



Para la cuantificación de este ensayo, el estándar más usado es el ácido gálico debido a su estructura simple, por ello los resultados se expresan como equivalente del ácido gálico (EAG), otros estándares que se pueden usar son el ácido cafeico, ácido ferúlico para plantas terrestres o floroglucinol para algas marinas (Christodoulou et al., 2022; Ford et al., 2019).

Entre los inconvenientes de este ensayo están la sensibilidad al pH, temperatura y tiempo de reacción, según las condiciones de trabajo se pueden exhibir diferentes valores; asimismo, se puede obtener una sobreestimación de los resultados debido a la presencia de interferentes que también pueden reaccionar con el reactivo de Folin - Ciocalteu (FC). Estos interferentes son compuestos no fenólicos como azúcares reductores (fructosa y glucosa), proteínas, tioles, vitaminas e iones inorgánicos (Mn^{2+} , Fe^{+2} , SO^{3+}) (Ford et al., 2019).

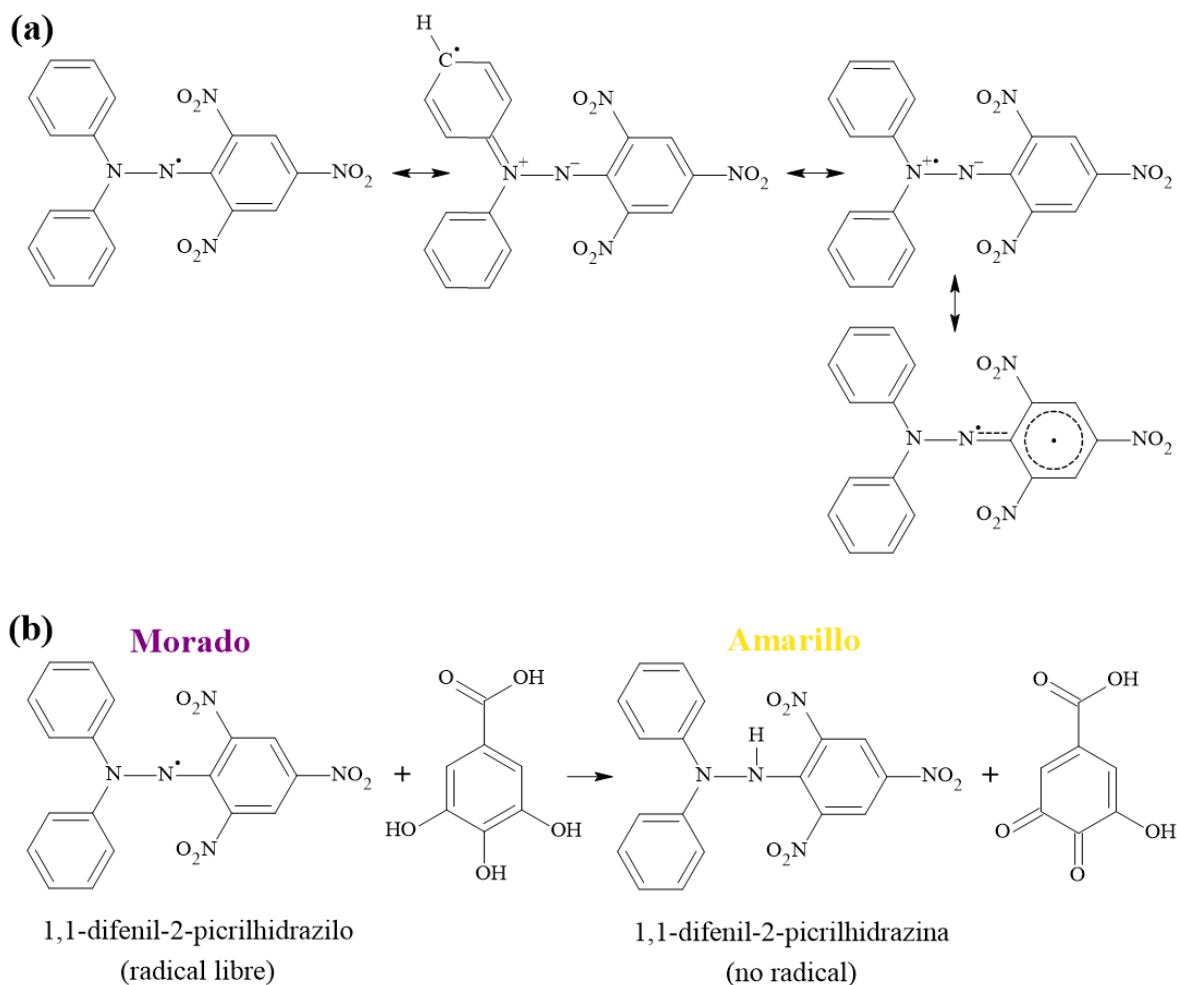
2. Determinación de la Actividad Antioxidante por el método de DPPH

En 1995, Brand Williams estudio la actividad antiradical o antioxidante de distintos compuestos fenólicos frente al radical libre de DPPH (Brand-Williams et al., 1995). El DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) es un radical libre estable debido a la distribución del electrón desapareado sobre la molécula (deslocalización electrónica) (**Figura 9.a**). El DPPH presenta una coloración violeta muy intensa que absorbe a longitudes de onda alrededor de los 515 a 520 nm, esta banda de máxima absorción desaparece luego de interactuar con los compuestos bioactivos, observándose el cambio de color a un amarillo tenue (decoloración). El porcentaje de decoloración indica el potencial de inhibición o captación del radical libre de los compuestos bioactivos. La reacción entre el compuesto bioactivo y el radical libre de DPPH genera el radical fenoxilo del compuesto, el cual se estabiliza con los electrones π de su anillo aromático, de este modo se permite la donación del hidrogeno para producir la forma no radicalaria de DPP-H (**Figura 9.b**) (Brand-Williams et al., 1995; Fernandez-Burgos, 2017).

Las condiciones eficaces para conseguir la eliminación del radical libre de DPPH son a temperatura ambiente, oscuridad y tiempos de reacción entre 30 min a 1 hora debido a que los compuestos oxidantes son sensibles al calor y a la luz. Este método es práctico, sencillo, preciso y repetible que puede emplearse en el análisis de alimentos, extractos, sueros, fluidos biológicos y compuestos bioactivos (polifenoles, flavonoides, entre otros) con naturaleza polar que pueden obtenerse en medios orgánicos (etanol, metanol y soluciones hidroalcohólicas). Entre los estudios y análisis que se pueden desarrollar están el CI_{50} y el TCI_{50} . El CI_{50} (concentración de inhibición media) indica la concentración o cantidad necesaria del antioxidante para inhibir hasta un 50% la concentración inicial del DPPH, mientras que el TCI_{50} se refiere al tiempo requerido para alcanzar el estado de CI_{50} (Christodoulou et al., 2022).

Figura 9

Método de DPPH. (a) Estructuras resonantes del radical libre de DPPH; (b) Reacción para la eliminación del radical libre de DPPH con ácido gálico.



3. Técnicas de Caracterización de Polímeros

Las técnicas de caracterización permiten analizar y evaluar las características y propiedades de los polímeros con el propósito de poder desarrollar biomateriales (películas y/o recubrimientos) y comprender sus funciones. Además de determinar la utilidad del biomaterial, se puede estudiar y analizar las interacciones entre sus constituyentes.

Entre las técnicas de caracterización para polímeros y biomateriales se encuentran: análisis morfológico (FESEM), comportamiento térmico (TGA), análisis espectroscópico (FTIR, RMN), análisis de Difracción de Rayos X (DRX) y el análisis viscosimétrico.

3.1. Resonancia Magnética Nuclear en estado sólido (RMNes)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica poderosa y versátil que permite obtener información para la elucidación de compuestos químicos, son de gran uso en la química orgánica. En el campo de los polímeros, permite el análisis cualitativo y cuantitativo de distintos materiales, proporciona información de la estructura al poder estudiar y analizar los tipos de monómeros o unidades repetitivas, distribución, composición, ramificación y grupos terminales (Danielsen et al., 2021). En adición, algunos polímeros no se pueden analizar por RMN en solución a menos que se modifique su estructura principal, en ese interés surgió la RMN en estado sólido (RMNes). La RMNes es empleado principalmente para el estudio de los polímeros debido a que se puede analizar las propiedades del polímero como flexibilidad, observar el empaquetamiento intermolecular, permite estudiar la cadena principal (tacticidad, uniones monoméricas, secuencia), la estructura secundaria (ordenamiento) y la estructura terciaria (plegamientos como en las proteínas) (H. N. Cheng & English, 2002); asimismo, se puede emplear para el control de calidad al observar la degradación del polímero, analizar geles y obtener información de la matriz polimérica (proporción de los monómeros), examinar sólidos multifase (cristalinas, amorfas e interfaciales), moléculas homopoliméricas, copolímeros, mezcla de polímeros entre otros (Bovey & Mirau, 1996; Cheremisinoff, 1996).

En general, en la espectroscopia de RMN, un núcleo atómico activo magnéticamente sometido a un campo magnético tiende a orientarse con el campo magnético, la energía para cambiar la orientación depende de la fuerza del campo y de la naturaleza del enlace entre los átomos y su entorno, el giro en su orientación genera una resonancia específica, permitiendo la caracterización de la molécula. Los núcleos más sensibles, abundantes y conocidos son: ^1H y ^{13}C (Cheremisinoff, 1996), otros núcleos de átomos activos de interés son: ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P y ^{29}Si (Hunt & James, 1993). En la RMN ^1H las señales de resonancia se deben a los tipos de hidrógenos presentes, donde la posición, anchura y área permiten la caracterización de la molécula. Del mismo modo, en la RMN ^{13}C la elucidación de la estructura de la molécula se da con relación al tipo de enlace del carbono y su entorno (Cheremisinoff, 1996).

En la RMNes de polímeros, se observa un ensanchamiento de las señales en los espectros debido a los efectos de acoplamiento dipolar entre núcleos y a la anisotropía del desplazamiento químico (δ). En el caso de la RMN en solución (RMN ^1H , ^{13}C), estos efectos

desaparecen porque las muestras se encuentran disueltas, las cadenas poliméricas tienen movimiento, observándose señales más estrechas y nítidas, mientras que en la RMNes la movilidad está restringida por la matriz polimérica, los núcleos están en posiciones fijas (rígidos), obteniéndose señales anchas, dando una visión más real del polímero (Bovey & Mirau, 1996; Carraher, 2020; Stepanov, 2016).

Las interacciones que contribuyen al ensanchamiento de las señales en los espectros RMNes (Stepanov, 2016) son:

- i. Interacción dipolo – dipolo: Interacción entre el núcleo principal y los núcleos adyacentes (vecindad), depende principalmente de la magnitud de los momentos magnéticos de los núcleos atómicos en interacción que del campo magnético aplicado.
- ii. Anisotropía del desplazamiento químico: Se presenta un acoplamiento magnético de los electrones circundantes. Si bien se tiene una interacción con el campo magnético, también se involucran los electrones contiguos; por ello, existe una sensibilidad al entorno y a los núcleos vecinos.
- iii. Interacciones cuadrupolares: Solo se evidencia cuando el número cuántico de espín es mayor a $\frac{1}{2}$, produciéndose la interacción entre el momento cuadrupolar eléctrico nuclear y la gradiente del campo eléctrico generados en el núcleo.

El predominio de una o más de estas interacciones determinan al espectro de RMNes (H. N. Cheng & English, 2002; Stepanov, 2016).

Un modo para corregir los efectos del acoplamiento dipolar es el empleo de la polarización cruzada (Cross polarization, CP) para aumentar la sensibilidad de los núcleos atómicos (Carraher, 2020). Con respecto a la anisotropía del desplazamiento químico, se realiza un giro de 54.6° al ángulo de la muestra con respecto al campo magnético a fin de anular sus efectos (Hunt & James, 1993), el cambio del ángulo es conocido como el ángulo mágico de giro (Magic angle spinning, MAS), los equipos de RMNes emplean rotores giratorios para realizar el giro de la muestra; es así, que la combinación del CP-MAS permite obtener buenos espectros de RMNes (Leary & Newman, 1992; Stepanov, 2016).

3.2. Espectroscopia Infrarroja (IR)

En el espectro electromagnético, la región del infrarrojo comprende 3 regiones: IR cercano (12800 a 4000 cm^{-1}), IR medio (4000 a 200 cm^{-1}) e IR lejano (200 a 10 cm^{-1}), siendo la región del IR medio la más empleada para el análisis de los compuestos. Mediante la espectroscopia Infrarroja (IR) se puede determinar los principales grupos funcionales que conforma la estructura de un compuesto químico (Gieroba et al., 2023; Sarmiento, 2022). El espectro IR se representa como el número de onda o frecuencia (cm^{-1}) frente a la absorbancia (A) o porcentaje de transmitancia (T), los cuales se relacionan según la siguiente ecuación:

$$\%T = A = \text{Log}_{10} (T^{-1}), T = \frac{\text{Potencia Transmitida}}{\text{Potencia Incidente}}$$

En la espectroscopia infrarroja, las bandas de absorción que se observan en el espectro IR a determinada frecuencia son producidas por los modos de vibración que experimentan los grupos atómicos de la molécula, luego de ser irradiados con radiación infrarroja; es así, que en el espectro IR se observa diferentes intensidades y posiciones de las señales, lo que permite su interpretación y comparación (Hong et al., 2021). En general, una molécula lineal de N átomos presenta 3N-5 modos de vibración (rotacionales y traslacionales) mientras que una molécula no lineal posee 3N-6 modos. Estos modos de vibración son específicos para determinado grupo de átomos, por lo que las bandas de absorción que se aprecian a determinadas frecuencias son características, permitiendo su identificación en el espectro IR. Cuando se tienen moléculas pequeñas es fácil distinguir los modos vibracionales; en el caso de moléculas grandes como los polímeros se cree que se deben considerar varios centros de interacción; sin embargo, las vibraciones que se producen presentan similares frecuencias; es decir, se evalúan a los monómeros o unidades repetitivas que conforman al polímero, por lo que las vibraciones también serán repetitivas, apreciándose en el espectro IR una banda de absorción correspondiente, por otro lado, las uniones monoméricas son más complejas de evaluar. Entre los modos de vibración moleculares están: Tensión simétrica y asimétrica, en donde se da un estiramiento y contracción a lo largo del enlace; Flexión simétrica y asimétrica, flexión fuera del plano simétrica y asimétrica, en donde se produce cambios o deformación a los ángulos de enlace, son comúnmente conocidos como modos de balanceo, aleteo, tijereteo y torsión (Billmeyer, 2020; Sperling, 2005).

En los polímeros, la espectroscopia IR proporciona información de la estructura del polímero (cristalinidad, orientación, modos de enlace, monómeros, grupos funcionales, entre otros), permite estudiar los procesos de oxidación, degradación, ciclación, polimerización entre otras reacciones, por medio del análisis de las señales: cambios en las intensidades o eliminación de ciertas señales, así como también corrimientos al compararse entre otros espectros IR (Sarmiento, 2022; Sperling, 2005). En adición, un caso complejo se presenta en los polisacáridos, el análisis del enlace glucosídico presenta cierta diferencia entre los espectros IR de los monosacáridos, disacáridos y polisacáridos debido a las diferentes configuraciones (α y β) que presenta el enlace glucosídico ($C1 \rightarrow C4$). Distintos estudios incidían que la posición y configuración del enlace glucosídico mostraban diferencias en los rangos de 1160 a 1130 cm^{-1} y de 998 a 965 cm^{-1} que se inferían a las vibraciones de estiramiento del puente glicosídico ($C1-O-C4$). En otros casos, el puente glicosídico surge en el rango de 960 a 920 cm^{-1} por la vibración de estiramiento simétrico, mientras que otros indicaban la vibración de estiramiento antisimétrico de la configuración β del enlace glucosídico a 1090 cm^{-1} y la antisimétrica de la configuración α cerca de 1151 cm^{-1} ; es así, que el análisis de las configuraciones de los enlaces glucosídicos en los polisacáridos es muy complejo (Nikonenko et al., 2000).

En general, para la interpretación del espectro IR de polisacáridos se deben considerar 5 zonas espectrales (Hong et al., 2021):

- i. **Zona I:** Comprende desde 4000 a 2500 cm^{-1} . Se exhibe una banda ancha e intensa entre 3600 a 3000 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del OH. En adición, bandas moderadas a $3000 - 2500\text{ cm}^{-1}$ asignado a las vibraciones de estiramiento simétrica y asimétrica del CH y CH_2 .
- ii. **Zona II:** Desde 1800 a 1500 cm^{-1} . Conocida como la zona del estiramiento de los dobles enlaces. Las bandas se atribuyen a la vibración de estiramiento de los dobles enlaces del grupo COO^- . También, aparece una banda cerca de 1635 cm^{-1} por la influencia del agua que puede cambiar dependiendo de su interacción.
- iii. **Zona III:** Desde 1500 a 1200 cm^{-1} . Llamada como la zona de simetría local. Se considera las vibraciones de deformación de los grupos con simetría local como el CH_2 y C-OH. Además, en esta zona debido a las distintas vibraciones se produce la superposición de las bandas por lo que la asignación es más compleja.

- iv. **Zona IV:** Entre 1200 a 800 cm^{-1} . Denominada la zona de la huella digital. Se tienen las bandas atribuidas a las configuraciones α y β del carbono anomérico.
- v. **Zona V:** $\sim 800 \text{ cm}^{-1}$. Conocida como la zona esquelética. Las bandas se atribuyen a las vibraciones esqueléticas de los carbohidratos. En caso de los polisacáridos, esta región es limitada y de difícil análisis.

Esta técnica es rápida, sencilla y no destructiva con la muestra. Por lo general, se trabaja con el modo de ATR (Reflectancia Total Atenuada), en donde es posible analizar películas, recubrimientos, interfases, polvos y soluciones debido a que en este modo se trabaja con un cristal de alto índice de refracción, permitiendo mejores propiedades de transmisión del IR, la radiación que ingresa se refleja internamente en la superficie del cristal y se atenúa por la absorción de la muestra que está en contacto, por ende, se obtiene un buen espectro. (Carraher, 2020; Gieroba et al., 2023; Hunt & James, 1993).

3.3. Difracción de Rayos X (DRX)

En la difracción de rayos x (DRX), una muestra es sometida a una radiación electromagnética, los rayos x inciden en los planos cristalográficos del material y se difractan en ángulos específicos, lo que permite su caracterización; la relación entre la distancia interplanar y el ángulo de difracción siguen la ley de Bragg. Mediante la técnica de DRX es posible determinar los parámetros de red, composición y estructura del material al evaluar la posición, forma e intensidad de los picos en los difractogramas (Bishnoi et al., 2017).

Los Rayos X (Rx) son radiaciones electromagnéticas de longitud de onda corta (λ , 0.05 – 0.25 nm). Estos se generan en un tubo de Rx en alto vacío, en donde se aplica un alto potencial entre un filamento de wolframio (W, cátodo) y un objetivo metálico (ánodo), los electrones emitidos del cátodo inciden en el ánodo produciendo los Rx. Entre los ánodos que se pueden emplear están el Mo, Fe, Cr y Cu. Las características del ánodo y el potencial aplicado determinan la longitud de onda de los Rx generados (Billmeyer, 2020). En los polímeros, se trabaja con la línea característica del Cu, $K\alpha$ (0.154 nm) mientras el resto de la radiación se elimina al usar filtros o monocromadores (Bishnoi et al., 2017).

La periodicidad en una cadena polimérica se determina por la unidad repetitiva o por el monómero que lo conforma; del mismo modo, en la difracción de rayos x, se busca la

distancia repetitiva entre cadenas poliméricas, para lo cual, si se consideran las cadenas como un sistema de capas, el espacio repetitivo entre estas capas será la distancia. Normalmente, en un sólido cristalino se considera las dimensiones de una celda unidad que es determinado por las posiciones de los rayos difractados, siendo la ubicación de los átomos que lo conforman deducidas por las intensidades relativas de los rayos difractados; en el caso de los polímeros, el análisis es más complejo, se requiere de información adicional para determinar la unidad repetitiva que va según la conformación y configuración de la cadena polimérica. En adición, a diferencia de los sólidos cristalinos que evidencian cierto ordenamiento, en los polímeros se tiene un mayor desorden, lo que se refleja como un ensanchamiento de los máximos de difracción en los difractogramas (Billmeyer, 2020). En algunos sistemas poliméricos, si se controla la temperatura y presión, se puede presentar cierta cristalinidad, permitiendo inferir la periodicidad y el alineamiento entre cadenas poliméricas. En sistemas de polímeros amorfos, las cadenas están distribuidos al azar, se tiene una mayor irregularidad por las ramificaciones o cadenas laterales por lo que su gráfica es muy difusa. Asimismo, en los sistemas semicristalinos, se analizan ambas partes (amorfa y cristalina), obteniéndose picos anchos y una zona difusa o región del halo amorfo a mayor ángulo de difracción (Sarmiento, 2022).

En general, la técnica de DRX permite analizar y evaluar la estructura cristalina, semicristalina y amorfa de distintos materiales; estudios de transformación de fases; análisis en la nanotecnología (nanotubos, nanopartículas o nanofibras poliméricas), arcillas, minerales, cerámicos, polímeros, metales, entre otros; permite cuantificar fases a través de las intensidades de difracción (Bishnoi et al., 2017; Jarrells & Munson, 2022).

3.4. Análisis Térmico

El análisis térmico involucra un conjunto de técnicas que permiten el estudio y análisis de los diferentes procesos que experimenta una muestra al someterse a cambios de temperatura predeterminada o en función del tiempo (Cheremisinoff, 1996). Entre las técnicas de interés se tienen: análisis termogravimétrico (TGA, thermogravimetric analysis), calorimetría diferencial de barrido (DSC, differential scanning calorimetry), análisis térmico diferencial (DTA, differential thermal analysis), análisis dinamo-mecánico (DMA, dynamo-mechanical analysis), análisis termo-mecánico (TMA, thermo-mechanical analysis), entre otros (Abraham et al., 2018; Carraher, 2020).

En el análisis termogravimétrico (TGA) se registra la variación del peso de la muestra con relación al incremento de la temperatura, a un flujo de calentamiento que puede fluctuar entre 10 a 30 °C min⁻¹ y en atmósfera controlada (aire o gas inerte), de esta manera se analiza el comportamiento o la estabilidad térmica del material en rangos amplios de temperatura (hasta los 1200 °C) (Hunt & James, 1993). Al suministrar calor a una muestra se generan cambios físicos y químicos que se pueden asociar a: pérdida de humedad y componentes volátiles, descomposición, degradación, reacciones de combustión, conversión de productos carbonosos y residuos incombustibles (Cheremisinoff, 1996; Danielsen et al., 2021). En caso de trabajar en atmósfera inerte, se evita los procesos de oxidación del material. Por otro lado, la degradación infiere rupturas o escisiones de las cadenas poliméricas; es así, que esta técnica permite analizar la estabilidad térmica u oxidativa del material, evaluar la sorción y desorción de disolventes o plastificantes, composición de materiales (aditivos, impurezas, disolventes), determinar la temperatura de descomposición, contenido de humedad y cenizas, entre otros (Abraham et al., 2018; Sarmiento, 2022).

En el TGA se pueden presentar tres modos de análisis, estas son: termogravimetría dinámica, se mide los cambios del peso en función de la temperatura; termogravimetría isotérmica, se registra la variación del peso en función del tiempo a temperatura constante; termogravimetría cuasi-isotérmica, se calienta en secuencias de tiempos hasta obtener una masa constante. (Danielsen et al., 2021; Hunt & James, 1993). El más empleado y sencillo es la termogravimetría dinámica.

3.5. Viscosimetría capilar para la determinación del peso molecular

La viscosimetría capilar es la técnica más empleada para calcular el peso molecular promedio de los polímeros. Esta técnica es sencilla, de fácil manejo, precisa y de bajo costo al no requerir reactivos complejos o tóxicos (Danielsen et al., 2021; Hunt & James, 1993). Los polímeros en solución adquieren un volumen mayor al del disolvente, evidencian una mayor viscosidad; por ello, se infiere que la viscosidad es proporcional al peso molecular del polímero (Brady et al., 2017). Para las mediciones de las viscosidades del polímero y del disolvente, se emplea un viscosímetro capilar del tipo Ubbelohde, en el cual se mide el tiempo que tarda un líquido en caer desde una marca superior hasta una marca inferior del capilar, se hace la comparación de los tiempos de la solución polimérica y del disolvente (Danielsen et al., 2021; Hunt & James, 1993). A partir de estos datos se obtienen los valores

de las viscosidades del polímero siguiendo las ecuaciones que se observan en la **Tabla 5** (Carraher, 2020).

Tabla 5

Terminologías de la viscosimetría

Nombre	Símbolo	Ecuación
Viscosidad relativa	η_r	$\eta_r = \frac{t_{muestra}}{t_{disolvente}}$; t: tiempo (s)
Viscosidad específica	η_{sp}	$\eta_{sp} = \frac{t_{muestra} - t_{disolvente}}{t_{disolvente}}$
Viscosidad reducida	η_{red}	$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$
Viscosidad inherente	η_{inh}	$\eta_{inh} = \frac{Ln(\eta_r)}{C}$; C: concentración
Viscosidad intrínseca	$[\eta]$	$[\eta] = \text{Lim } (\eta_{red})_{c \rightarrow 0} \text{ o } \text{Lim } (\eta_{inh})_{c \rightarrow 0}$

A determinadas condiciones, el polímero en solución evidencia una viscosidad intrínseca característica, el cual se relaciona con el volumen hidrodinámico del polímero y depende del peso molecular promedio, la concentración del polímero, la distribución e interacción de las cadenas poliméricas, el disolvente o medio y la temperatura. En casos de polielectrolitos iónicos, la presencia de contraiones en el disolvente provoca una expansión de las cadenas poliméricas debido a los efectos de la repulsión electrostática, incrementando la viscosidad; caso contrario, en macromoléculas neutras se experimenta una menor viscosidad; es así que, para evitar los efectos de repulsión electrostática, se suele trabajar con medios de cloruro de sodio como es en el caso del alginato (Belalia & Djelali, 2014).

Para la determinación de la viscosidad intrínseca se considera las ecuaciones de Huggins y Kraemer, a partir de sus gráficas se realiza una extrapolación a concentraciones diluidas ($c \rightarrow 0$) de la solución polimérica (Gómez-Díaz & Navaza, 2002; Sperling, 2005):

- Ecuación de Huggins: $\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + K_1 [\eta]^2 \times C$
- Ecuación de Kraemer: $\frac{Ln(\eta_r)}{C} = [\eta] - K_2 [\eta]^2 \times C$

En la construcción de las gráficas de Huggins y Kraemer, es recomendable trabajar en bajas concentraciones del polímero a fin de evitar la presencia de curvas pronunciadas en las gráficas que impedirían la extrapolación; asimismo, concentraciones muy altas del polímero afecta al tiempo de ensayo y al capilar (Ramsackal et al., 2019).

A partir de la viscosimetría intrínseca se puede calcular la masa molar promedio del polímero, considerando que el polímero tiene monómeros distribuidos en secuencias y ordenamientos aleatorios, la masa molar comprenderá el promedio de las masas moleculares que lo conforman (Brady et al., 2017; Gacén et al., 2000); por consiguiente, la viscosimetría intrínseca y la masa molar promedio se relacionan acorde a la ecuación de Mark – Houwink:

$$[\eta] = K M_v^\alpha$$

Donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca (mL g^{-1})

M_v : Masa molar promedio

K (mL g^{-1}) y α : constantes

En general, la constante α varía entre 0,5 – 1, dependiendo del disolvente. α es 0,5 cuando el disolvente mantiene al polímero enrollado, α está entre 0,65 – 0,8 cuando se tiene un buen disolvente y α es 1 cuando las moléculas son rígidas y asimétricas (A. Masuelli, 2018; Brady et al., 2017).

3.6. Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM)

La microscopía electrónica de barrido por emisión de campo permite estudiar y analizar la morfología, sección transversal, espesores y el comportamiento superficial como porosidad y uniformidad de películas, recubrimientos, sistemas compuestos, nanoestructuras entre otros, aplicados en cerámicos, minerales, polímeros, biociencia y demás áreas (Che Hak et al., 2015; K. J. Kim et al., 1992).

La FESEM proporciona imágenes de alta resolución y amplia gama de contraste, esta técnica permite trabajar con aumentos de 10x a 300 000x y una profundidad casi ilimitada para obtener sistemas en 3D; asimismo, se trabaja con bajo potencial que va entre 0,5 kV – 30 kV, obteniéndose imágenes más nítidas y menos distorsionadas a comparación de los

equipos convencionales (Ahmad-Fauzi & Sean, 2021; Mayeen et al., 2018). El trabajar con bajo potencial de aceleración permite controlar la energía de aterrizaje de los electrones a fin de tener un equilibrio en la superficie de la muestra entre los electrones incidentes y salientes, de este modo se evita el fenómeno de carga en la superficie, se reduce los daños por el haz de electrones en la muestra, se reduce las aberraciones cromatográficas y esféricas del haz de electrones, se mejora los aspectos superficiales, lo que se refleja en una mejor calidad de imagen (K. J. Kim et al., 1992; Yu et al., 2010).

Al comparar con otras técnicas, en la FESEM se tiene una mejor resolución que en la microscopía electrónica de barrido (SEM) y se evita los problemas de incertidumbre en las imágenes de muestras pretratadas que se evidencia en la microscopía electrónica de transmisión (TEM), debido a que en la FESEM se emplea un cañón de emisión de campo de electrones, un sistema de lentes especiales y en conjunto con las características del equipo crea sondas de escaneo más estrechas que se dirigen en zig-zag a la muestra, lo que se evidencia en una mejor resolución (K. J. Kim et al., 1992). Asimismo, en esta técnica se puede indagar áreas muy pequeñas o zonas focalizadas a fin de observar trazas o contaminantes en las muestras y también en casos de materiales aislantes no es necesario un revestimiento a diferencia de otras técnicas (Mayeen et al., 2018).

En la FESEM se emplea una fuente de emisión de campo que produce los electrones, los cuales son acelerados por un campo eléctrico, concentrados en una columna de alto vacío y enfocados - orientados por un sistema de lentes que bombardea al objeto (muestra), de esta manera se emiten los electrones secundarios con velocidad y ángulo característico acorde de la superficie de la muestra, estos electrones son captados por el detector y dan una señal electrónica específica que es amplificada y transformada en una imagen (Ahmad et al., 2021). La columna de alto vacío es importante debido a que evita las alteraciones del haz de electrones que se generan en el proceso para capturar la imagen (Jaya, 2020). Dependiendo del detector es posible obtener la morfología y composición de los materiales; los detectores de electrones secundarios brindan información superficial mientras que los detectores de electrones retrodispersados reportan la composición elemental (Che Hak et al., 2015).

Por lo general, las muestras se cortan en tamaños de 5x5x5 mm, son recubiertas con oro u oro-paladio y son sometidos a un alto vacío a fin de eliminar burbujas o gases interferentes antes del análisis morfológico (Jaya, 2020).

CAPÍTULO III.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En este trabajo de investigación se busca aprovechar al máximo los recursos hidrobiológicos a fin de extraer en conjunto o en serie distintos compuestos que puedan servir para la elaboración de una película bioactiva. La película será a base del alginato de sodio y como aditivo antioxidante se empleará extractos polifenólicos de macroalgas pardas. Por consiguiente, es necesario analizar y evaluar las características del alginato y de los extractos, ambos obtenidos de las macroalgas pardas; asimismo, caracterizar la película.

El trabajo preliminar partió de la recolección del material de interés, las cuales fueron dos especies de macroalgas pardas procedentes de Paracas e identificadas como *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*.

Como trabajo experimental se realizó la limpieza, el lavado, el secado y la molienda de las dos especies; luego se realizó un análisis cuantitativo para determinar el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin - Ciocalteu en distintos extractos de las muestras con la finalidad de seleccionar el medio idóneo de extracción. El ensayo se realizó por triplicado para la veracidad de los resultados. También, se realizó la determinación de la actividad antioxidante de todos los extractos mediante el método de DPPH, obteniéndose el porcentaje de inhibición y el coeficiente de inhibición media, de esta forma se evaluó e identificó los extractos que se emplearon en la elaboración de la película. Como proceso continuo, se realizó la extracción del alginato de sodio de las especies de macroalgas pardas pretratadas. En última etapa, se elaboraron películas bioactivas con todos los compuestos extraídos de las macroalgas pardas.

Finalmente, la caracterización del alginato extraído se realizó mediante el análisis de las técnicas de FTIR, TGA, DRX, RMN¹H, RMNeS y viscosimetría capilar mientras que las películas bioactivas elaboradas fueron evaluadas mediante sus propiedades físicas y por las técnicas de FTIR, TGA, DRX, opacidad, FESEM y actividad antioxidante. En adición, se realizó un análisis preliminar de los materiales bioactivos frente a un fruto climatérico.

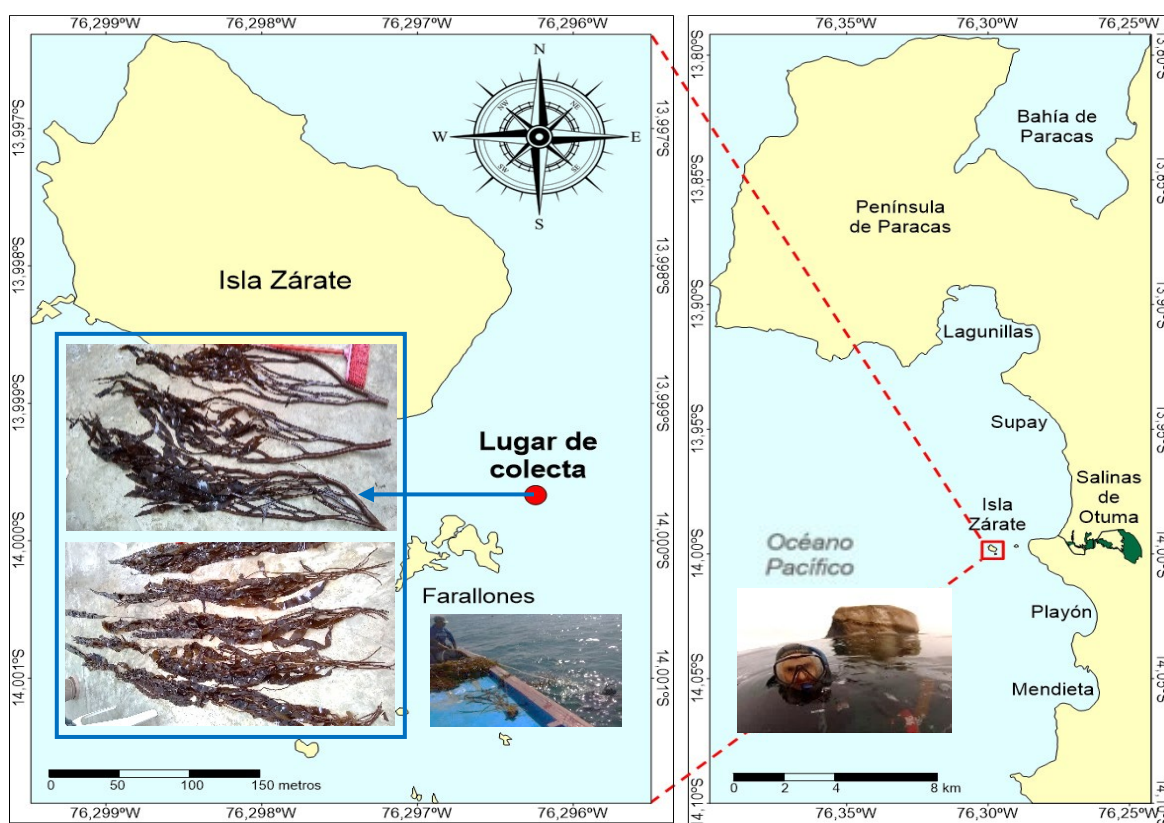
A. TRABAJO PRELIMINAR

1. Recolección de la muestra

La zona de recolección se localizó frente a la isla Zárate y los farallones, a 3.5 km al suroeste de la playa Supay con coordenadas a 76°17'48.10" L.W. y 13°59'58.77" L.S. y a una profundidad de 6 metros, en el distrito de Paracas, provincia de Pisco, departamento de Ica (Figura 10). La recolección se realizó el 27 de mayo del 2019 mediante el método de buceo con compresora de aire y fue asistido por una embarcación pequeña.

Figura 10

Zona de recolección de las especies de macroalgas pardas, Paracas.



Se recolectaron dos especies de macroalgas pardas con un peso en frío de 10 Kg, estas fueron preservadas en un cooler hasta su traslado al laboratorio de la Facultad de Ciencias. La recolección de dos especies permitió analizar comparativamente el rendimiento de extracción del alginato, la cuantificación de fenoles totales, la actividad antioxidante y elaborar películas bioactivas, debido a que cada especie evidencia distintas características.

2. Determinación (Identificación) Botánica

La identificación botánica de las dos macroalgas pardas fue realizada por el Biólogo marino Ernesto Pariona Icochea, acorde al sistema de Guiry & Guiry. (2019). En la **Tabla 6** se indica la clasificación taxonómica de las muestras en estudio.

Tabla 6

Clasificación taxonómica de las macroalgas pardas recolectadas de Paracas.

<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C. Agardh 1820		<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta & Santelices 1986	
			
Dominio	Eukaryota	Dominio	Eukaryota
Reino	Chromista	Reino	Chromista
Phylum	Ochrophyta	Phylum	Ochrophyta
Clase	Phaeophyceae	Clase	Phaeophyceae
Subclase	Fucophycidae	Subclase	Fucophycidae
Orden	Laminariales	Orden	Laminariales
Familia	Lessoniaceae	Familia	Lessoniaceae
Género	Macrocystis	Género	Lessonia
Especie	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Especie	<i>Lessonia trabeculata</i>

En el **Anexo 1 (Pág. 178)** se presenta el resumen del informe de la identificación botánica de las especies en estudio.

B. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. Reactivos

La **Tabla 7** indica los reactivos necesarios para el desarrollo del trabajo de investigación.

Tabla 7

Reactivos para el trabajo experimental.

Reactivos	Marca	Especificaciones
N - Hexano	Merck	QP
Etanol, C ₂ H ₅ OH	Merck	Absoluto, PA
Metanol, CH ₃ OH	Merck	PA
Cloroformo, CHCl ₃	Merck	PA
Acetato de etilo	Merck	PA
Formaldehído, CH ₂ O	Merck	37 %
Ácido Clorhídrico 37 %, HCl	Merck	PA
Hidróxido de Sodio, NaOH	Merck	PA
Carbonato de sodio, Na ₂ CO ₃	Merck	PA
Cloruro de Calcio, CaCl ₂	Supelco, Merck	PA
Glicerol	Sigma-Aldrich	99%
Polietilenglicol	Sigma-Aldrich	Promedio Mn 400
Ácido gálico	Merck	Anhidro, para síntesis
Floroglucinol	Merck	99%
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Sigma - Aldrich	CAS 1898-66-4
Reactivo de Folin & Ciocalteu, 2 N	Sigma - Aldrich	PA/RA

Nota. QP: Químicamente Puro; PA/RA: Reactivo para análisis; CAS: Chemical Abstracts Service.

2. Equipos y materiales

La **Tabla 8** indica los equipos que se utilizaron para desarrollar la etapa de extracción del alginato y obtención de los extractos de las macroalgas pardas.

Tabla 8

Equipos para el trabajo experimental.

Equipos	Marca	Laboratorio
Agitadores magnéticos	DAIHAN Scientific MSH-20D	LIBIPMET
Agitadores de Alto torque	BIOBASE OS40-S	LIBIPMET
Enfriador de agua (Water Chiller)	DAIHAN Scientific WCL	LIBIPMET
Moedor doméstico	BOSCH	LIBIPMET
Liofilizador	LABCONCO	LIBIPMET
Balanza	VIBRA	GISMA
Bomba de vacío	DAIHAN Scientific CH	GISMA
Agitador Vortex	KYNTTEL	GISMA
Medidor de pH	OAKTON Ph700	GISMA
Rotavapor	BIOBASE RE100-Pro	GISMA
Estufa	BINDER LF225DR	GISMA
Ultracentrífuga	Centrifuge 5810 R	GISMA

Nota. LIBIPMET: Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos.

GISMA: Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados.

Otros materiales que se emplearon fueron: vasos de precipitados 2 L y 3 L, matraces aforados de 10 mL, 50 mL, 250 mL y 1000 mL, baguetas, espátulas, placas Petri de 90 x 20 mm y 150 x 22 mm, micropipetas de 1000 μ L y 5000 μ L, termómetro, pastillas de agitación, papel indicador (0 – 14), probetas 10 mL 25 mL y 100 mL, parafilm, soporte universal con nuez, papel filtro rápido Whatman, viales de 5 mL, tubos para centrifuga de 50 mL, frascos ámbar de 100 mL y 1000 mL, embudos, filtros de nylon de 0.45 μ m, jeringas de 50 mL, papel de aluminio y balones de destilación de 100 mL, 250 mL, 500 mL y 1000 mL.

La **Tabla 9** indica los equipos empleados para la caracterización del alginato, la determinación de fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos de las macroalgas pardas y de las caracterizaciones de las películas bioactivas elaboradas.

Tabla 9

Equipos y laboratorios de ejecución para las caracterizaciones.

Equipo	Marca	Laboratorio
Espectrofotómetro FT-IR	IRPrestige-21 SHIMADZU	GISMA, UNI (Perú)
Espectrofotómetro UV-Vis	Perkin Elmer Lambda 25	GISMA, UNI (Perú)
Espectrofotómetro UV-Vis	Perkin Elmer Lambda 365+	GISMA, UNI (Perú)
Viscosímetro de Ostwald	Fungilab, CANNON	LIBIPMET, UNI (Perú)
Difractómetro de Rayos X (DRX)	BRUKER D2 PHASER	TECMARA, UNI (Perú)
Analizador Térmico (TG/DTA)	Perkin Elmer STA 6000	TECMARA, UNI (Perú)
Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear	Bruker Avance III HD	Dpto. Química, PUCP (Perú)
Espectrómetro de RMN ¹³ C-CP-MAS	Bruker Avance III 400	UFSCar (Brasil)
Analizador Termogravimétrico (TGA)	TA INSTRUMENT Q50	LATEQS – IQSC, USP (Brasil)
Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM)	Schottky JSM-7200F	CAQI – IQSC, USP (Brasil)
Difractómetro de Rayos X (DRX)	BRUKER D8 ADVANCE	IQSC, USP (Brasil)
Espectrofotómetro UV-Vis	Varían Cary 50 Bio	IFSC, USP (Brasil)

Nota. GISMA: Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados

LIBIPMET: Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos

TECMARA: Tecnología de Materiales para Remediación Ambiental

UFSCar: Universidad Federal de São Carlos

USP: Universidad de São Paulo

IQSC: Instituto de Química de São Carlos

IFSC: Instituto de Física de São Carlos

CAQI: Central de Análises Químicas Instrumentais

LATEQS: Laboratório de Análise Térmica, Electroanalítica e Química de Soluções

3. Tratamiento de la muestra

Las macroalgas se descongelaron por 24 horas a temperatura ambiente, luego fueron limpiadas, lavadas con agua destilada y separadas en tallos y hojas. Después, las muestras fueron estiradas sobre papel kraft y secadas a 40 °C durante una semana; finalmente, se molió en un molinillo doméstico, se pesó y se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente, rotulados acordes a su especie, procedencia y masa. La **Figura 11** esquematiza el tratamiento de las muestras y la **Tabla 10** indica las cantidades obtenidas por cada especie.

Figura 11

Esquema del tratamiento de las muestras de macroalgas pardas procedentes de Paracas.



Tabla 10

Cantidades obtenidas luego del tratamiento de las muestras.

Muestra	Especie	Parte de la Muestra	Masa molida (g)
Muestra #1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	289,64
Muestra #2	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Tallos	92,77
Muestra #3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas	609,46
Muestra #4	<i>Lessonia trabeculata</i>	Tallos	450,02

4. Obtención de los extractos de las macroalgas pardas

El proceso de extracción se realizó por maceración en diferentes medios con la finalidad de seleccionar el medio idóneo de extracción. Los medios de extracción empleados fueron: metanol, etanol y soluciones hidroalcohólicas a distintas concentraciones. Todos los extractos fueron analizados por espectroscopía UV-Vis para la determinación del contenido fenólico total (CFT) y la determinación de la actividad antioxidante.

Previamente se realizó un desengrasado, para el cual la muestra molida se maceró con n-hexano en relación de 1:12 (p/v) con agitación de 200 rpm a temperatura ambiente por 24 horas, luego el sólido fue separado por centrifugación a 5 000 rpm durante 8 minutos, el sólido remanente fue secado en la campana extractora.

El sólido remanente seco se maceró con el solvente en relación de 1:10 (p/v) durante 24 horas, a 450 rpm y a 40 °C. Luego, el extracto fue centrifugado por 8 min a 4 500 rpm y seguidamente se pasó por filtros de nylon (0.45 µm) a fin de conseguir la separación del extracto y del sólido. El residuo sólido se secó a 50 °C y el extracto resultante se conservó en un frasco ámbar a -10 °C hasta su posterior análisis. Este procedimiento se realizó para cada medio de extracción y por triplicado.

Para la obtención de los rendimientos, en el caso de los extractos de metanol y etanol, cada extracto se concentró a sequedad en un rotavapor a 45 °C y se registraron los pesos. En el caso de los extractos hidroalcohólicos, luego de concentrar cada extracto en el rotavapor en las mismas condiciones, el líquido sobrante fue liofilizado, después se pesó y se determinó el rendimiento de las muestras. Los sólidos obtenidos se almacenaron en frío para su posterior análisis.

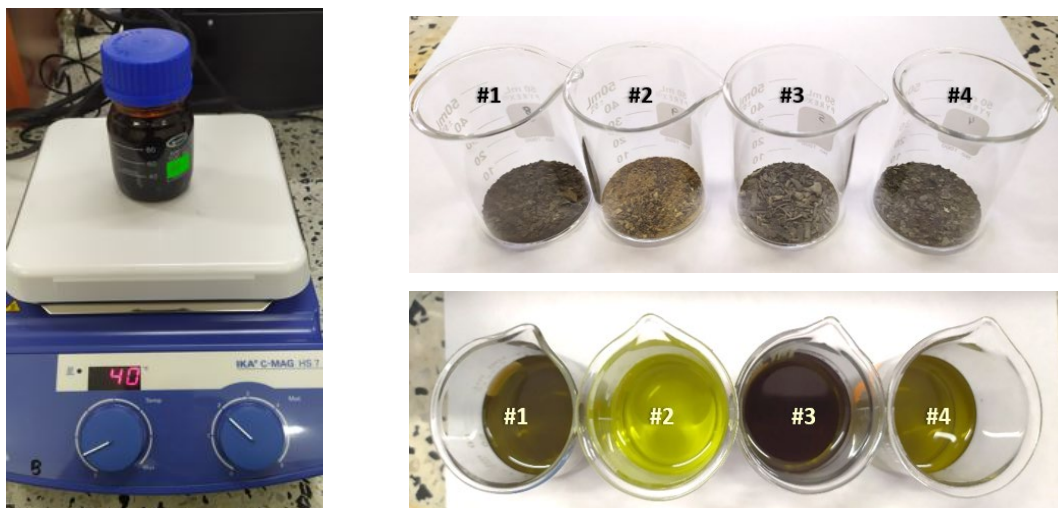
El rendimiento fue expresado como:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa final de extracto (g)}}{\text{Masa de la macroalga seca (g)}} \times 100 \%$$

La **Figura 12** presenta algunos de los extractos obtenidos de las hojas y tallos de las dos especies de macroalgas en distintos medios de extracción.

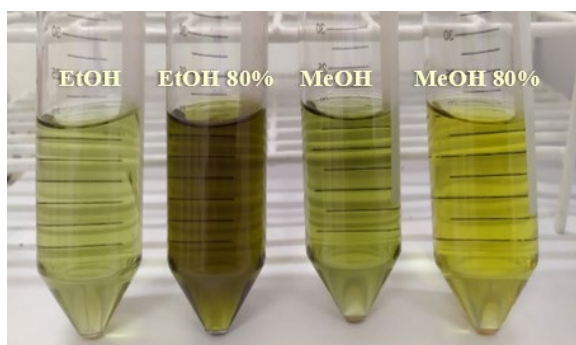
Figura 12

Maceración de las muestras de M. pyrifera y L. trabeculata en distintos solventes.

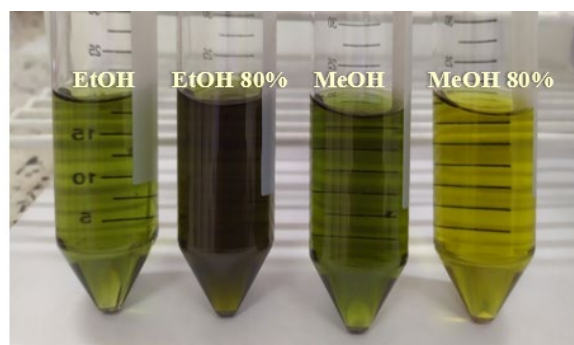


Macrocystis pyrifera

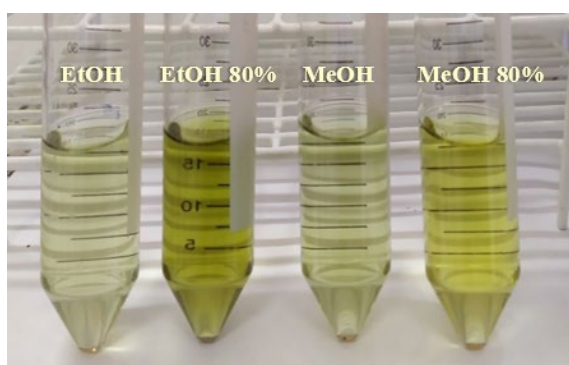
Lessonia trabeculata



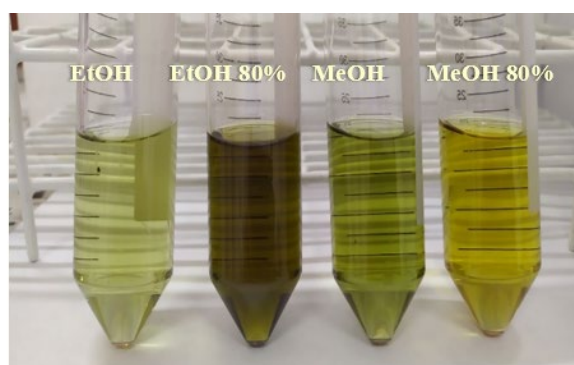
Muestra # 1 (Hojas)



Muestra # 3 (Hojas)



Muestra # 2 (Tallos)



Muestra # 4 (Tallos)

5. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos de las macroalgas

La determinación del contenido fenólico total (CFT) de las muestras se realizó por el método de Folin - Ciocalteu. En este ensayo se emplea el reactivo de Folin - Ciocalteu, constituido por una mezcla del ácido fosfotúngstico y el ácido fosfomolibdico, los cuales en presencia de compuestos fenólicos y en un medio básico se reducen a una mezcla de óxidos. La evidencia del ensayo se observa en el cambio de coloración de amarillo a un azul intenso que ocurre en la reacción, siendo el máximo de absorción a 765 nm.

El procedimiento experimental para la determinación del CFT fue adaptado a nuestras condiciones de acuerdo con los ensayos de Echevarría et al., 2009; Leyton et al., 2016; Mamani et al., 2020. Este procedimiento consistió en la preparación de la muestra, preparación de la curva de calibración y ejecución del ensayo. En todos los casos se efectuaron los análisis por triplicado.

A continuación, se detallan el procedimiento y las condiciones de trabajo.

a. Preparación de la muestra

La obtención de los extractos se describió anteriormente (Ver Cap. III, B.4., Pág. 66).

b. Preparación de la curva de calibración

- Solución madre de ácido gálico (200 mg L⁻¹): Se pesó 10 mg de ácido gálico, se disolvió en agua ultrapura y se enrasó en una fiola de 50 mL.
- Estándares de ácido gálico (AG): A partir de la solución madre de ácido gálico se prepararon 12 estándares con concentraciones entre 5 a 200 mg L⁻¹.
- Solución madre de floroglucinol (200 mg L⁻¹): Se pesó 10 mg de floroglucinol, se disolvió en agua ultrapura y se enrasó en una fiola de 50 mL.
- Estándares de floroglucinol (FG): A partir de la solución madre de floroglucinol se prepararon 12 estándares con concentraciones entre 5 a 200 mg L⁻¹.

c. Procedimiento del ensayo

- Solución de Carbonato de sodio al 7.5 % (p/v): Se pesó 15 g de carbonato de sodio, se disolvió en agua ultrapura y se enrasó en una fiola de 200 mL.

- Solución del reactivo Folin - Ciocalteu 0.2 N: A partir del reactivo Folin - Ciocalteu 2 N, se tomó 25 mL y se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 250 mL.
- Estándares: En un tubo de ensayo se colocaron 1 mL del estándar, 2 mL del Na_2CO_3 7.5 %, 1.5 mL de F-C 0.2 N, después de la adición de cada reactivo se agitó y se completó con agua ultrapura hasta un volumen de 10 mL, se volvió a agitar y se dejó reposar 1 hora en un ambiente oscuro. Esto se realizó para todos los estándares.
- Blanco de los estándares: 2 mL del Na_2CO_3 7.5 %, 1.5 mL de F-C 0.2 N, agua ultrapura hasta completar 10 mL, se agitó y se dejó reposar 1 hora en la oscuridad.
- Muestras: Los extractos obtenidos fueron completados a un volumen de 20 mL con sus respectivos solventes. A partir de ello, en un tubo de ensayo se colocaron 200 μL de la muestra, 2 mL del Na_2CO_3 7.5 %, 1.5 mL de F-C 0.2 N, se completó con agua ultrapura (completar 10 mL), se agitó y se dejó reposar 1 hora en la oscuridad.
- Blanco de las muestras: En un tubo de ensayo se colocó 200 μL del medio de extracción, 2 mL del Na_2CO_3 7.5 %, 1.5 mL de F-C 0.2 N, agua ultrapura hasta completar 10 mL, se agitó y se dejó en la oscuridad por 1 hora.
- En todos los casos (estándares y muestras), transcurrido el tiempo del ensayo se realizó la lectura de la máxima absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en un espectrofotómetro UV/Vis.

d. Resultados del ensayo

Los resultados son expresados como miligramo equivalente de ácido gálico por 100 gramos de alga seca ($\text{mg Eq AG} / 100 \text{ g de macroalga seca}$) y como miligramo equivalente de floroglucinol por 100 gramos de alga seca ($\text{mg Eq FG} / 100 \text{ g de macroalga seca}$).

6. Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos de las macroalgas

La actividad antioxidante de las muestras se realizó por el método del radical libre DPPH*, en donde el radical libre estable del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (color violeta) posee un electrón deslocalizado que al entrar en contacto con un compuesto captador de radicales libres o donador de hidrógeno se evidencia un cambio de color de violeta a amarillo. La deslocalización del electrón del radical libre intensifica el color violeta que absorbe a una longitud de onda de 517 nm.

La determinación de la actividad antioxidante fue adaptado a nuestras condiciones de acuerdo con los trabajos de Leyton et al., 2016 y Mamani et al., 2020. Para todos los casos y a modo comparativo se realizó el análisis por triplicado.

A continuación, se describen el procedimiento y las condiciones de trabajo.

a. Preparación de la muestra

La obtención de los extractos se describió anteriormente (Ver Cap. III, B.4., Pág. 66).

b. Procedimiento del ensayo

- Solución de DPPH (142 mg L^{-1}): Se pesó 14.2 mg de DPPH, se disolvió en metanol y se enrasó en una fiola de 100 mL. La solución de DPPH se mantuvo refrigerada en un frasco ámbar (evitar exposición a la luz) hasta su utilización.
- Muestras: Los extractos obtenidos fueron completados a un volumen de 20 mL con sus respectivos solventes. A partir de ello, en un tubo de ensayo se colocaron 1 mL de la muestra, 8 mL de metanol, 1 mL de la solución de DPPH, se agitó y se dejó reposar por 30 minutos en un entorno oscuro.
- Control: En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del solvente, 1 mL de la solución de DPPH y 8 mL de metanol, se agitó y se dejó en la oscuridad por 30 minutos.
- Blanco: En un tubo de ensayo se añadió 1 mL del medio de extracción y se completó a 10 mL de metanol, se agitó y se dejó en la oscuridad por 30 minutos.
- En todos los casos, después de los 30 minutos se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV/Vis.

Adicionalmente, se realizó la determinación del coeficiente de inhibición media (CI_{50}), definido como la cantidad mínima necesaria de antioxidante para inhibir al 50 % la concentración de DPPH. El CI_{50} se obtiene al graficar el porcentaje de inhibición frente a distintas concentraciones del extracto; por ende, se construyó una curva de regresión de 5 puntos para cada muestra. A partir de los extractos se tomaron alícuotas en orden creciente de volumen y se completaron a un volumen de 5 mL acorde al medio de extracción de cada muestra. Cada nueva concentración siguió el procedimiento del ensayo de DPPH descrito anteriormente. Del mismo modo, para el comparativo con el ácido gálico se consideró las mismas proporciones de las muestras, blanco y control según el solvente de trabajo.

c. Resultados del ensayo

Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición, según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{Am - Abm}{A_{DPPH}}\right) \times 100$$

Donde: Am : Absorbancia de la muestra o estándar

Abm : Absorbancia del blanco de la muestra o estándar

A_{DPPH} : Absorbancia de la solución de DPPH

El CI_{50} o IC_{50} se determinó a partir de la curva de regresión del porcentaje de inhibición en función de la concentración para cada muestra.

7. Particionamiento de los extractos de las macroalgas pardas

En base a los análisis por espectroscopía UV/Vis de los extractos, se realizó un particionamiento de las muestras con mejores resultados para cada especie. El procedimiento experimental para el particionamiento fue adaptado a nuestras condiciones de trabajo, según las investigaciones de Chandini et al., 2008, Leyton et al., 2016 y Olate-Gallegos et al., 2019; siendo el particionamiento en orden creciente de polaridad.

El sólido liofilizado obtenido anteriormente (Ver Cap. III, B.4., Pág. 66) fue disuelto con 50 mL de agua ultrapura, luego se trasvasó a una pera de decantación y se adicionó 25 mL de hexano, se agitó vigorosamente, luego se dejó reposar y se decantó. El proceso se repitió con otros 25 mL de hexano, las fases de hexano se juntaron en un frasco ámbar y la fase acuosa fue tratada con 25 mL de cloroformo (por duplicado), igualmente se repitió el proceso con 25 mL de acetato de etilo (por duplicado) y luego con 25 mL de butanol (por duplicado). Finalmente, para el caso de las fases orgánicas, estas fueron concentradas a sequedad en un rotavapor a 40 °C mientras que la fase acuosa fue liofilizada. Posteriormente, las muestras fueron envasadas en viales de 5 mL, rotuladas y almacenadas en frío para su posterior análisis. A las particiones obtenidas (a excepción de la fase hexano) se le realizó el análisis de la actividad antioxidante, siguiendo el procedimiento del ensayo de DPPH descrito anteriormente (Ver Cap. III, B.6., Pág. 69).

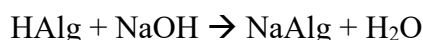
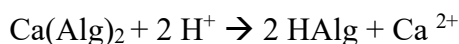
8. Extracción del Alginato de Sodio de las macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*

La extracción del alginato de sodio a partir de las macroalgas pardas fue adaptada de los procedimientos descritos por Fertah et al., 2014; Gomez et al., 2009; Hernández-Carmona et al., 2012; Leal et al., 2008; Leyton et al., 2016.

En general, el procedimiento se dividió en 3 etapas:

- i. La primera etapa comprendió el desengrasado con n-hexano, seguido de la obtención de los extractos hidroalcohólicos y una decoloración con una solución de formaldehído, de esta forma se remueven los compuestos lipofílicos, pigmentos, compuestos polifenólicos entre otros componentes presentes en la macroalga y que son afines en estos solventes.
- ii. La segunda etapa albergó la extracción sólido - líquido de las muestras con una solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3). El alginato que se obtiene es producto del intercambio de iones de sodio que ingresan a la matriz polimérica y se intercambia con otros iones que están en menor proporción.
- iii. Finalmente, la tercera etapa comprendió un intercambio iónico con cloruro de calcio, seguido de un tratamiento ácido – base con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio respectivamente. En esta etapa ocurre nuevamente un intercambio iónico, en donde se separan las impurezas remanentes y se obtiene el alginato de calcio ($\text{Ca}(\text{Alg})_2$), que al ser tratado en un medio ácido se transforma en ácido algínico (HAlg) y es nuevamente transformado a alginato de sodio (NaAlg) a través de un tratamiento básico.

Las reacciones que se involucran en este proceso son las siguientes:



A continuación, se detalla el procedimiento experimental de cada etapa. Asimismo, para obtener los rendimientos de extracción se realizó el trabajo por triplicado.

a. Desengrasado, obtención de los extractos y decoloración de las muestras

En un frasco ámbar de 500 mL se colocó 25 g de muestra seca y molida, luego se adicionó n-hexano en relación de 1:12 (p/v) y se dejó agitar durante 24 horas a temperatura ambiente. Después, el sólido se filtró y se secó en la campana extractora durante 30 minutos para eliminar las trazas de solvente. El líquido remanente se concentró en un rotavapor para recuperar el n-hexano. El sólido seco se maceró con etanol al 80 % en relación de 1:10 (p/v) con agitación a 450 rpm durante 24 horas a 40 °C. Posteriormente, el extracto se centrifugó a 4500 rpm durante 8 minutos, luego se filtró con filtros de nylon de 0.45 µm. El residuo líquido (extracto) se refrigeró en un frasco ámbar a -10°C. El sólido remanente se trató con una solución de formaldehído al 0,1 % (v/v) en relación de 1:20 (p/v) durante 10 horas con agitación constante y a temperatura ambiente. Finalmente, el sólido se filtró y se secó en la estufa a 50 °C durante 24 horas. Este sólido fue empleado en la etapa de extracción.

b. Extracción sólido-líquido

El sólido obtenido (Sec. 8.a.) se colocó en un vaso de precipitado de 1 L que contenía 500 mL de una solución de carbonato de sodio al 3 % (p/v). Las condiciones de extracción que se mantuvieron fueron un pH de 10, en baño maría a 80 °C, con agitación a 1200 rpm empleando un equipo de alto torque durante 2 horas. Después, se retiró del baño maría y al lodo alcalino resultante se le adicionó 250 mL de agua destilada, se agitó por 15 minutos y luego se centrifugó a 10 000 rpm durante 20 minutos a fin de separar el sólido del líquido. El extracto alcalino resultante fue vertido lentamente en un vaso de precipitado que contenía etanol en una relación de 1:1 (v/v), obteniéndose un precipitado que fue lavado con etanol absoluto. Finalmente, el sólido se filtró y se secó a 45 °C. El líquido remanente fue concentrado en un rotavapor para recuperar el solvente.

c. Purificación

El sólido obtenido en la etapa anterior se trató con 200 mL de una solución de cloruro de calcio 0.05 mol L⁻¹ a temperatura ambiente con agitación constante durante 2 horas, luego se dejó reposar por 30 minutos y las fibras (alginato de calcio) obtenidas se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 minutos. Estas fibras se sometieron a un tratamiento ácido hasta obtener un pH ~ 2 con una solución de ácido clorhídrico 0.1 mol L⁻¹, se agitó por 1 hora a temperatura ambiente y las nuevas fibras (ácido alginico) se centrifugaron a 10 000 rpm por 20 minutos.

Las fibras obtenidas fueron tratadas con una solución de hidróxido de sodio 0.1 mol L⁻¹ hasta obtener entre pH 7 – 8, de esta manera se transformó el ácido algínico a alginato de sodio; por último, la solución de alginato de sodio fue precipitado en etanol (relación 1:1, v/v), se centrifugó (10 000 rpm, 10 minutos) y se secó a 45 °C. El alginato de sodio extraído de cada muestra fue refrigerado hasta su caracterización y posteriormente fueron utilizados en la elaboración de las películas.

El rendimiento de la extracción fue expresado como:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa de alginato extraído (g)}}{\text{Masa de la macroalga seca (g)}} \times 100 \%$$

En el **Anexo 2** (Pág. 182) se tiene el diagrama del proceso de extracción de los extractos y alginatos; en adición, el **Anexo 3** (Pág. 184) esquematiza todo el proceso.

9. Elaboración de las películas cargadas con los extractos de las macroalgas pardas

Las películas bioactivas a base del alginato y los extractos de las macroalgas pardas se desarrollaron en dirección a los estudios similares de Aloui et al., 2021; Blachechen & Petri, 2020; Cao et al., 2009; Giz et al., 2020; Kim et al., 2018.

A partir de los productos extraídos de las especies de *M. pyrifera* y *L. trabeculata* en las secciones anteriores se elaboraron diferentes películas bioactivas; para ello, se empleó el alginato de sodio como matriz polimérica de las películas y como agente bioactivo los extractos hidroalcohólicos de cada especie de macroalga parda. A modo comparativo, se elaboró con las mismas proporciones películas a base del alginato referencial o comercial. Para lo cual, se preparó una solución de alginato al 1.75% (p/v) de cada muestra, cada alginato se disolvió en agua a 70 °C con agitación constante. Luego, se adicionó una mezcla del plastificante al 1.5% (p/v) y se agitó durante 30 minutos a 50°C. Posteriormente, se incorporó 10 mL del extracto hidroalcohólico continuando la agitación durante 30 minutos a 40 °C, luego se dejó reposar a temperatura ambiente. La mezcla de los reactivos conformó la solución formadora, del cual 25 mL se vertió en placas acrílicas de 90 x 90 mm y se dejó secar a 35 °C por 24 horas. Luego del secado, las películas fueron sumergidas en una mezcla de cloruro de calcio al 2 % (p/v) y plastificante al 1 % (p/v) durante 1 minuto, se lavó con agua destilada y se dejó secar a 30 °C.

En la **Tabla 11** se indican los constituyentes de las películas elaboradas con el alginato referencial y los alginatos extraídos de las hojas de cada especie de macroalga parda mientras en la **Figura 13** se presenta el proceso de elaboración.

Tabla 11

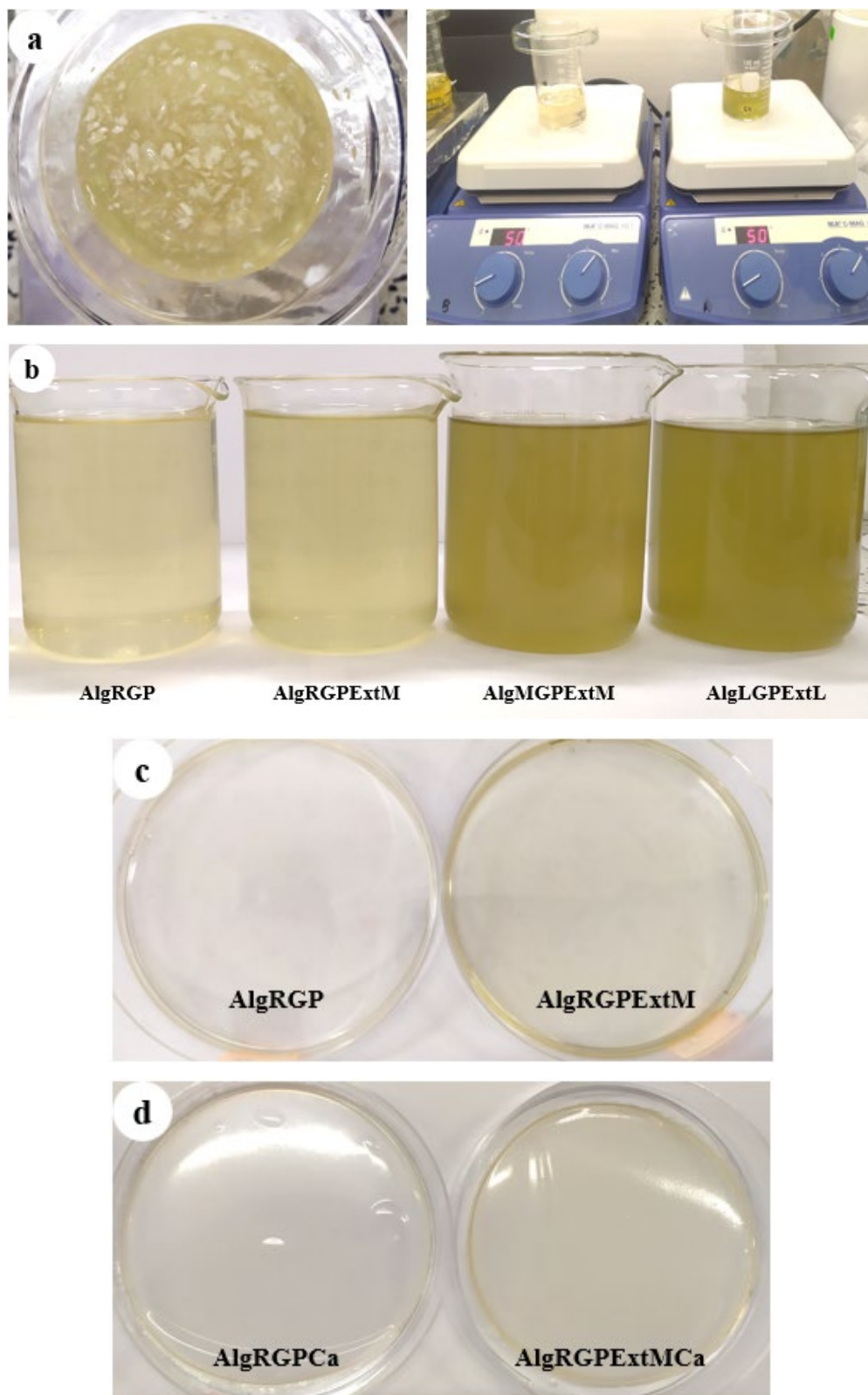
Constituyentes de las películas a base del alginato referencial y alginatos extraídos.

Código	Alginato	Plastificante	Extracto (Ext.)	Reticulación
AlgRGP	1.75% AlgR	G:P (9:1)		
AlgRGPCa	1.75% AlgR	G:P (9:1)		CaCl ₂ 2%
AlgRGPExtM	1.75% AlgR	G:P (9:1)	Ext. <i>M. pyrifera</i>	
AlgRGPExtMCA	1.75% AlgR	G:P (9:1)	Ext. <i>M. pyrifera</i>	CaCl ₂ 2%
AlgRGPExtL	1.75% AlgR	G:P (9:1)	Ext. <i>L. trabeculata</i>	
AlgRGPExtLCA	1.75% AlgR	G:P (9:1)	Ext. <i>L. trabeculata</i>	CaCl ₂ 2%
AlgMGP	1.75% AlgM	G:P (9:1)		
AlgMGPCa	1.75% AlgM	G:P (9:1)		CaCl ₂ 2%
AlgMGPExtM	1.75% AlgM	G:P (9:1)	Ext. <i>M. pyrifera</i>	
AlgMGPExtMCA	1.75% AlgM	G:P (9:1)	Ext. <i>M. pyrifera</i>	CaCl ₂ 2%
AlgLGP	1.75% AlgL	G:P (9:1)		
AlgLGPCa	1.75% AlgL	G:P (9:1)		CaCl ₂ 2%
AlgLGPExtL	1.75% AlgL	G:P (9:1)	Ext. <i>L. trabeculata</i>	
AlgLGPExtLCA	1.75% AlgL	G:P (9:1)	Ext. <i>L. trabeculata</i>	CaCl ₂ 2%

Nota. AlgR: Alginato referencial (Sigma-Aldrich)
 AlgM: Alginato extraído de *Macrocystis pyrifera*
 AlgL: Alginato extraído de *Lessonia trabeculata*
 G:P (9:1): Glicerol: PEG400 en relación 9:1
 ExtM: Extracto de *M. pyrifera*
 ExtL: Extracto de *L. trabeculata*
 Ca: Reticulación con cloruro de calcio al 2 % w v⁻¹

Figura 13

Elaboración de las películas. (a) Disolución del alginato; (b) Soluciones formadoras; (c) Películas base (AlgRGP) y cargada (AlgRGPExtM); (d) Películas reticuladas.



CAPÍTULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS

1. Obtención de los extractos de las macroalgas pardas

El rendimiento de extracción es expresado como:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa final de extracto (g)}}{\text{Masa de macroalga seca (g)}} \times 100 \%$$

En la **Figura 14** y **Tabla 12** se evidencian los rendimientos obtenidos de los extractos de las macroalgas pardas según la especie y el solvente o medio de extracción.

Figura 14

Diagrama de datos comparativos de los extractos de macroalgas pardas según el solvente.

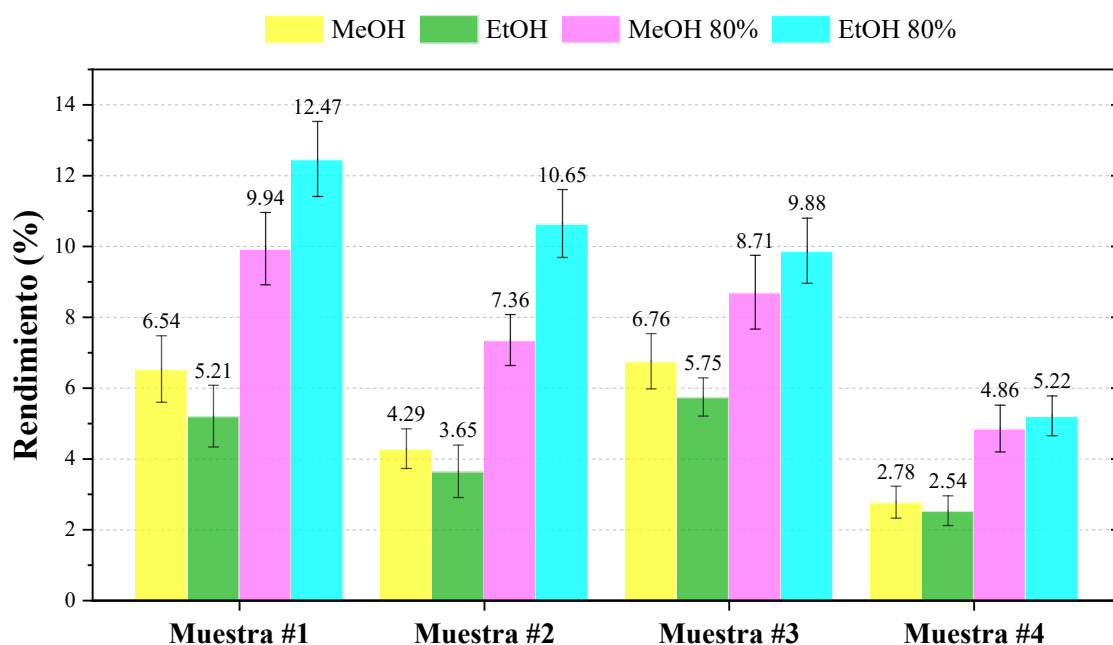


Tabla 12

Rendimientos obtenidos de los extractos de las macroalgas pardas.

Muestra	Especie	Parte	Solvente	Rendimiento (%)
#1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	MeOH	6.54 ± 0.94
#2		Tallos		4.29 ± 0.56
#3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas		6.76 ± 0.78
#4		Tallos		2.78 ± 0.45
#1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	EtOH	5.21 ± 0.87
#2		Tallos		3.65 ± 0.74
#3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas		5.75 ± 0.54
#4		Tallos		2.54 ± 0.42
#1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	MeOH 80%	9.94 ± 1.02
#2		Tallos		7.36 ± 0.72
#3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas		8.71 ± 1.04
#4		Tallos		4.86 ± 0.66
#1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	EtOH 80%	12.47 ± 1.06
#2		Tallos		10.65 ± 0.96
#3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas		9.88 ± 0.92
#4		Tallos		5.22 ± 0.56

Nota. Ensayos por triplicado para cada muestra; EtOH: etanol; MeOH: metanol.

Acorde a los datos experimentales se infieren los siguientes resultados:

Los medios hidroalcohólicos (MeOH 80% y EtOH 80%) evidenciaron mayores rendimientos que el metanol y etanol en cada especie debido a la afinidad con el medio. Existen diversos factores que involucran la extracción de compuestos, siendo el de mayor interés la polaridad del solvente, distintos estudios en algas infieren altos rendimientos de extracción en mezclas de solventes, entre estos los hidroalcohólicos son los más empleados debido a la variación de polaridad de los medios involucrados, así se extrae fácilmente compuestos afines (Aroa López & Argimiro Rivero, 2011; Leyton et al., 2016).

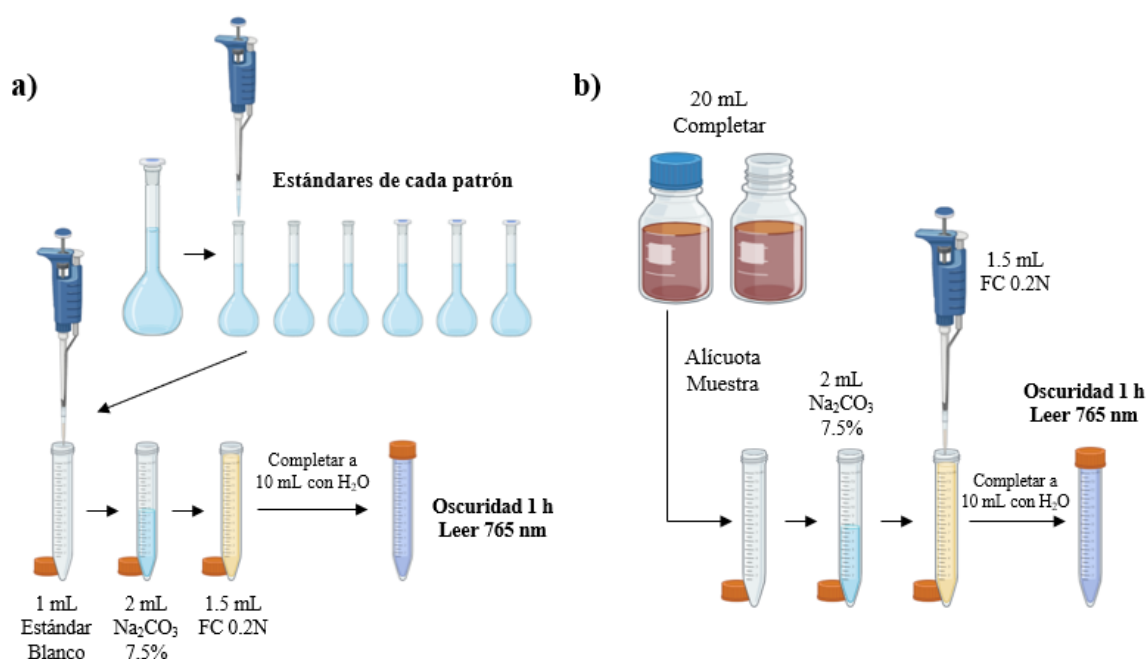
Al comparar las partes de las macroalgas, las hojas (Muestras #1 y #3) de ambas especies presentan mayores rendimientos que los tallos (Muestras #2 y #4) tanto en los medios alcohólicos e hidroalcohólicos. Además, el menor rendimiento en cada solvente se observó en los tallos de la *L. trabeculata* (Muestra #4) con coloraciones de extractos más tenues a comparación de las otras muestras. Estas particularidades pueden deberse a las diferencias de las muestras sólidas, los tallos son más rígidos que las hojas en ambas especies, aún más rígidos son los tallos de la *L. trabeculata* que los tallos de la *M. pyrifera*; por lo tanto, la extracción no es homogénea debido a que en muestras más finas se abarca mayor área de contacto y es más fácil el ingreso e interacción entre el solvente y la macroalga a comparación de partículas más rígidas y grandes (Consuegra, 2014; Leyton et al., 2016).

2. Determinación del Contenido Fenólico Total de los extractos de macroalgas

La **Figura 15** esquematiza el ensayo del CFT de los extractos de macroalgas y de los estándares. Las muestras partieron con masas aproximadas de 2 gramos de macroalga seca que fueron maceradas con el solvente en relación 1:10 (p/v).

Figura 15

Ensayo del CFT: a) en los estándares; b) en los extractos de las macroalgas pardas.



2.1. Curva de Calibración

La **Tabla 13** presenta los datos de los estándares de ácido gálico y floroglucinol para la elaboración de las curvas de calibración con volúmenes de ensayo del CFT a 10 mL y absorbancias registradas a 765 nm. La **Figura 16** esquematiza las respectivas curvas de calibración.

Tabla 13

Curva de calibración en base al patrón de ácido gálico (AG) y floroglucinol (FG).

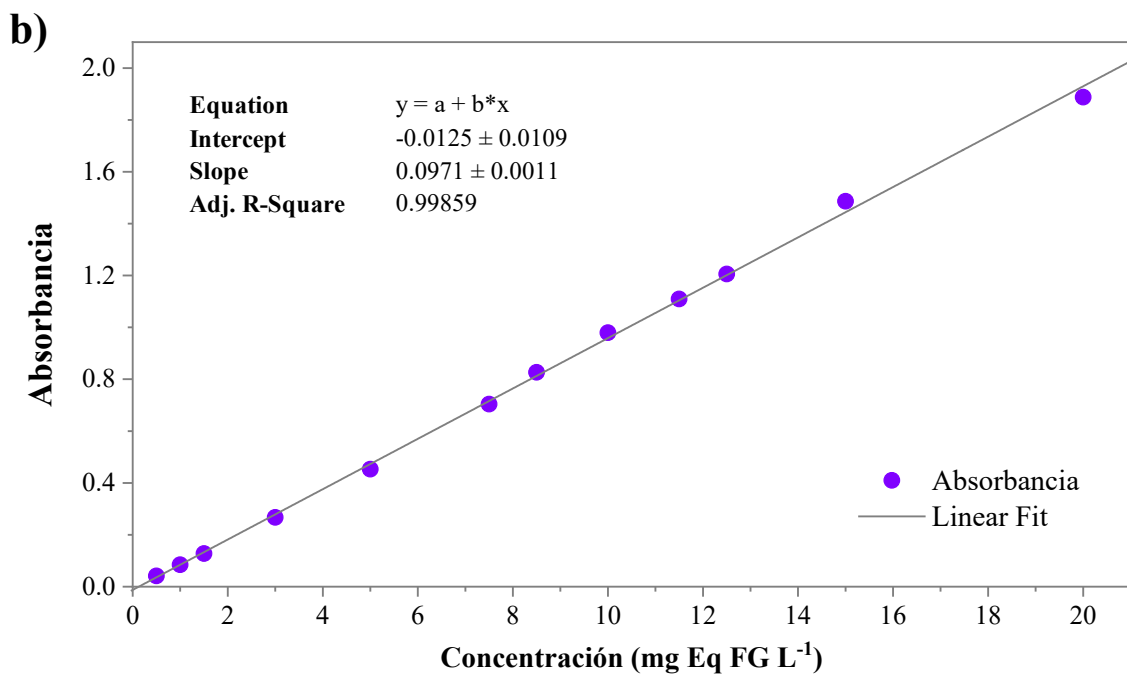
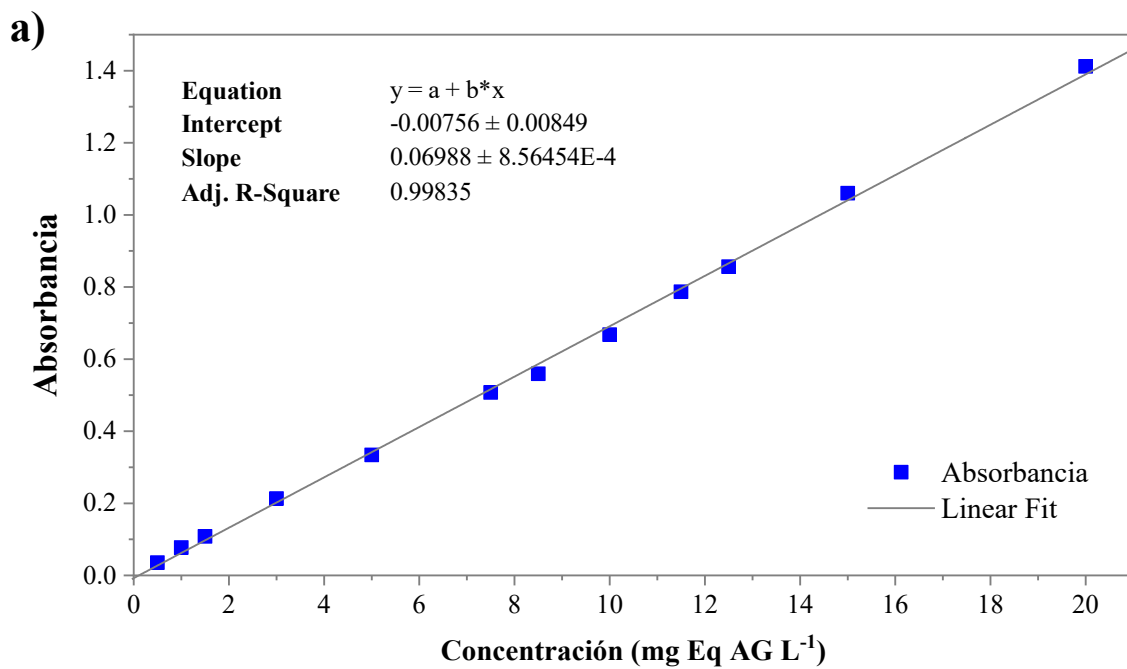
Estándar	Concentración (mg L ⁻¹)	Concentración de Ensayo (mg L ⁻¹)	Absorbancia (765 nm)	
			Ácido gálico	Floroglucinol
E1	5	0.50	0.03527	0.04124
E2	10	1.00	0.07722	0.08460
E3	15	1.50	0.10835	0.12750
E4	30	3.00	0.21323	0.26705
E5	50	5.00	0.33414	0.45280
E6	75	7.50	0.50722	0.70370
E7	85	8.50	0.55922	0.82684
E8	100	10.00	0.66761	0.97940
E9	115	11.50	0.78671	1.10960
E10	125	12.50	0.85621	1.20550
E11	150	15.00	1.06032	1.48620
E12	200	20.00	1.41180	1.88750
Ecuación de la recta de regresión lineal				
Ácido gálico (AG)		y = 0.06988 x - 0.00756		
Floroglucinol (FG)		y = 0.09710 x - 0.01250		
y = Absorbancia (765 nm); x = Concentración en mg Eq (AG o FG) L ⁻¹				

Nota. mg Eq AG L⁻¹: miligramo equivalente de ácido gálico por litro de extracto.

mg Eq FG L⁻¹: miligramo equivalente de floroglucinol por litro de extracto.

Figura 16

Curva de Calibración del: a) ácido gálico (AG); b) floroglucinol (FG).



2.2. Determinación de la concentración equivalente en las muestras

La determinación del contenido fenólico total (CFT) equivalente de ácido gálico o floroglucinol se expresa como mg Eq (100 g MS)⁻¹ y se obtiene de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{mg Eq}}{100 \text{ g MS}} = \text{Concentración} \left(\frac{\text{mg Eq}}{\text{L}} \right) \times \frac{\text{Vol. Ensayo (mL)}}{\text{Alicuota Ensayo (mL)}} \times \frac{\text{Vol. extracción (L)}}{\text{masa MS (g)}} \times 10^2$$

Donde:

mg Eq: miligramo equivalente de AG o FG (según se desee expresar)

MS: macroalga seca

Volumen del ensayo: 10 mL en todos los casos

Alicuota del ensayo: 1 mL para cada medio de extracción

Volumen de extracción: 0.02 L en todos los casos

Masa: aproximadamente 2 g para cada muestra

Concentración (mg Eq L⁻¹): se obtiene de las rectas de regresión lineal (AG o FG)

La cuantificación de fenoles se expresa como equivalente del estándar, en plantas terrestres el estándar más empleado es el ácido gálico (AG), otra opción de estándar dirigido a muestras marinas como las macroalgas es el floroglucinol (FG) debido a su semejanza estructural a la base de los florotaninos, los cuales están presentes en las macroalgas marinas (Mekinić et al., 2019).

La **Tabla 14** presenta el CFT de los extractos en medios alcohólicos (metanol y etanol) e hidroalcohólicos a diferentes proporciones de etanol (50%, 60%, 70%, 80% y 90%), en todos los casos se realizó el ensayo por triplicado. La codificación MpH y MpT indican *Macrocystis pyrifera* Hojas y Tallos respectivamente, mientras la codificación LtH y LtT indican *Lessonia trabeculata* Hojas y Tallos correspondientemente. En adición, la **Figura 17** representa los datos comparativos del CFT de los extractos de las macroalgas pardas a distintos medios de extracción.

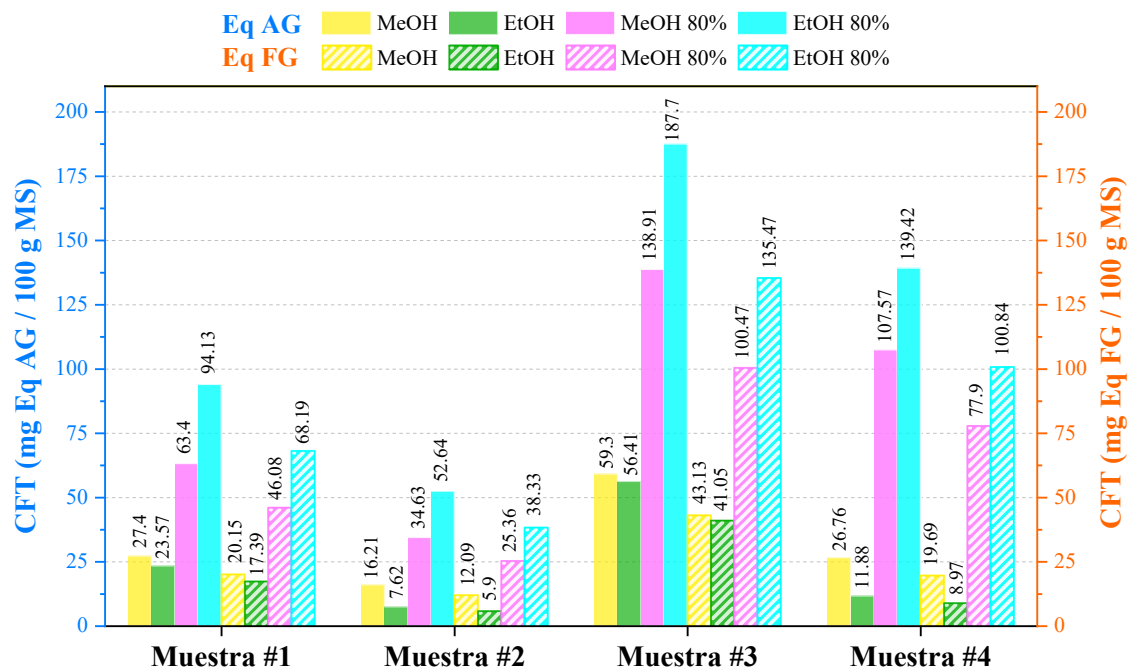
Tabla 14*Contenido Fenólico Total de los extractos de las macroalgas pardas.*

Muestra / Código	Medio de extracción	Concentración mg Eq AG/100g MS	Concentración mg Eq FG/100g MS
#1 - MpH	MeOH	27.40 ± 0.64	20.15 ± 0.52
#2 - MpT		16.21 ± 0.73	12.09 ± 0.45
#3 - LtH		59.30 ± 1.07	43.13 ± 0.92
#4 - LtT		26.76 ± 0.55	19.69 ± 0.86
#1 - MpH	MeOH 80%	63.40 ± 0.94	46.08 ± 0.68
#2 - MpT		34.63 ± 1.03	25.36 ± 0.83
#3 - LtH		138.91 ± 1.11	100.47 ± 1.02
#4 - LtT		107.57 ± 1.09	77.91 ± 0.89
#1 - MpH	EtOH	23.57 ± 0.78	17.39 ± 0.88
#2 - MpT		7.62 ± 0.95	5.90 ± 0.53
#3 - LtH		56.41 ± 1.17	41.05 ± 0.99
#4 - LtT		11.88 ± 1.06	8.97 ± 0.79
#1 - MpH	EtOH 80%	94.13 ± 1.01	68.19 ± 0.93
#2 - MpT		52.64 ± 1.17	38.33 ± 0.84
#3 - LtH		187.70 ± 1.12	135.47 ± 1.04
#4 - LtT		139.42 ± 1.23	100.84 ± 1.15
CFT de los extractos hidroalcohólicos en distintas proporciones de EtOH			
#1 - MpH	EtOH 50%	120.90 ± 1.10	87.50 ± 0.81
#3 - LtH		227.75 ± 1.28	164.47 ± 0.92
#1 - MpH	EtOH 60%	110.17 ± 1.01	79.76 ± 0.73
#3 - LtH		223.62 ± 1.24	161.49 ± 0.89
#1 - MpH	EtOH 70%	104. 79 ± 1.04	75.89 ± 0.75
#3 - LtH		197.15 ± 1.22	142.42 ± 1.01
#1 - MpH	EtOH 90%	33.08 ± 1.29	24.23 ± 0.93
#3 - LtH		81.35 ± 1.05	59.01 ± 0.76

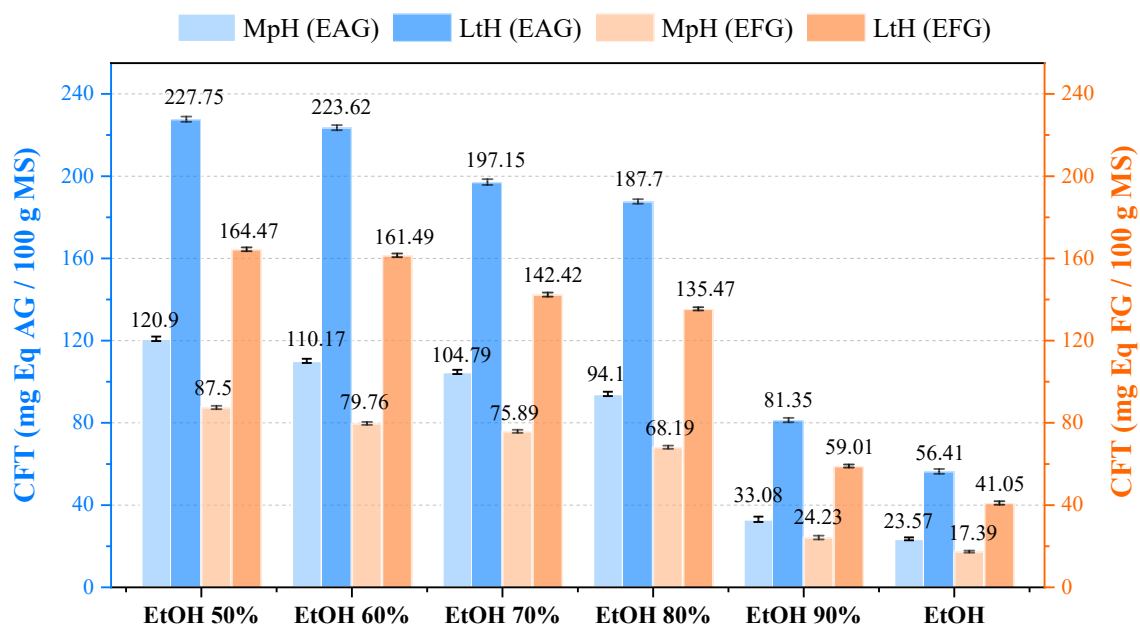
Figura 17

Diagrama de datos comparativos del CFT de los extractos de macroalgas pardas: a) en distintos medios de extracción, b) a distintas proporciones de etanol.

a)



b)



Acorde a los datos experimentales se infieren los siguientes resultados:

De la **Figura 17.a**, la *L. trabeculata* presenta mayor respuesta del CFT que la *M. pyrifera*, siendo la Muestra #3 (LtH) el de más alto CFT en todos los medios. En función de las partes de las macroalgas, las hojas en ambas especies evidencian mejores resultados en cada medio de extracción. Con respecto al medio de extracción, los extractos hidroalcohólicos revelaron altos índices del CFT; sin embargo, existen diferencias entre las proporciones del etanol. El etanol es un buen solvente para extraer compuestos bioactivos que pueden emplearse en la industria farmacéutica, cosmética, alimenticia, entre otros, a comparación del metanol y la acetona que son dañinos y no son permitidos en áreas de alimentos (Y. Li et al., 2017); además, anteriormente se indicó que medios hidroalcohólicos presentan mayor variación de la polaridad por lo que extraen distintos compuestos afines (Aroa López & Argimiro Rivero, 2011); por ello, se optó por evaluar distintas proporciones de etanol a fin de seleccionar el medio idóneo de extracción, este ensayo solo se evaluó en las hojas de cada especie debido a que mostraron mejores resultados. De la **Figura 17.b**. se observa que en EtOH 50% el CFT es mayor en ambas especies; sin embargo, es necesario considerar el proceso de obtención y estabilidad de los extractos. El alga presenta un elevado grado de hinchamiento frente al agua por ser altamente hidrofílico, por lo que es necesario una proporción alga/solvente mayor a fin de poder separar el extracto de la biomasa y obtener regular cantidad, lo que involucra costos de solventes y procesos de separación adicionales; esto se observó en los medios de EtOH 50% y 60%, en los cuales se realizaron entre dos y tres centrifugaciones para la separación del extracto, mientras que en los demás medios solo requirió una centrifugación y los extractos obtenidos pudieron pasar fácilmente por los filtros de nylon. Otro detalle, es la estabilidad de los extractos acuosos o que poseen mayor proporción de agua debido a que tienden a degradarse más rápido, además se puede producir un crecimiento microbiano, los cuales proliferan en el agua, para evitar estos inconvenientes se puede adicionar conservantes como el ácido ascórbico (Leyton et al., 2016); sin embargo, en estos medios también se extraen ciertos polisacáridos (alginato, fucoidanos, etc.) que son solubles en agua y que pueden causar inconvenientes. Entre estos se puede aprovechar el hecho de que el alginato es insoluble en etanol (Gomez et al., 2009), no obstante, otros compuestos o metabolitos de interés son afines al etanol; por tales motivos, se opta por trabajar con mayores proporciones de etanol (70% u 80%), asimismo, para seleccionar el medio idóneo de extracción se debe analizar también la actividad antioxidante de cada uno.

En general, los compuestos fenólicos tienen un alto poder reductor por lo que este método brinda una aproximación del contenido fenólico; sin embargo, este ensayo en realidad mide el contenido de compuestos capaces de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (reacción tipo redox); por consiguiente, este ensayo es poco sensible debido a la presencia de compuestos reductores no fenólicos o interferentes como azúcares reductores, pigmentos, proteínas, tioles, aminas aromáticas, ácidos orgánicos, iones inorgánicos (Fe^{2+} , Mn^{2+} , I^-) entre otros presentes en las muestras y que ocasionan valores altos del CFT, en caso se requiera un mejor análisis, se debe aislar o purificar los compuestos de interés a fin de eliminar los interferentes (Ford et al., 2019; Mekinić et al., 2019)

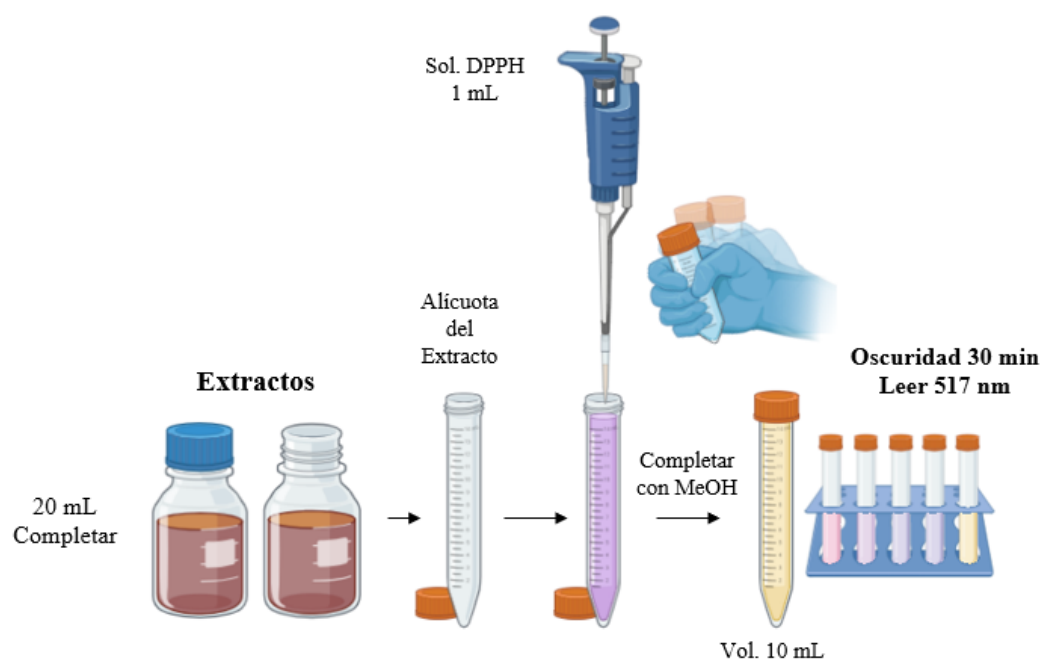
3. Determinación de la Actividad Antioxidante de los extractos de las macroalgas

3.1. Ensayo de DPPH de los extractos

La **Figura 18** representa el tratamiento de los extractos para determinar la actividad antioxidante por el método de DPPH (radical libre). Los extractos se trabajaron a una relación 1:10 (p/v) de masa de macroalga y volumen de solvente.

Figura 18

Tratamiento de los extractos de macroalgas pardas para el ensayo de DPPH.*



La actividad antioxidante se expresa como:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{Am - Abm}{A_{DPPH}}\right) \times 100$$

Donde: Am es la absorbancia de la muestra (extracto), Abm es la absorbancia del blanco de cada muestra (solvente) y el A_{DPPH} es la absorbancia de la solución de DPPH.

La **Tabla 15** muestra el porcentaje de inhibición y el coeficiente de inhibición media (CI_{50}) de los extractos de macroalgas pardas. La **Figura 19** representa los datos comparativos del porcentaje de inhibición de las macroalgas pardas en distintos medios de extracción y en distintas proporciones de etanol. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tabla 15

Porcentaje de Inhibición y CI_{50} de los extractos de las macroalgas pardas.

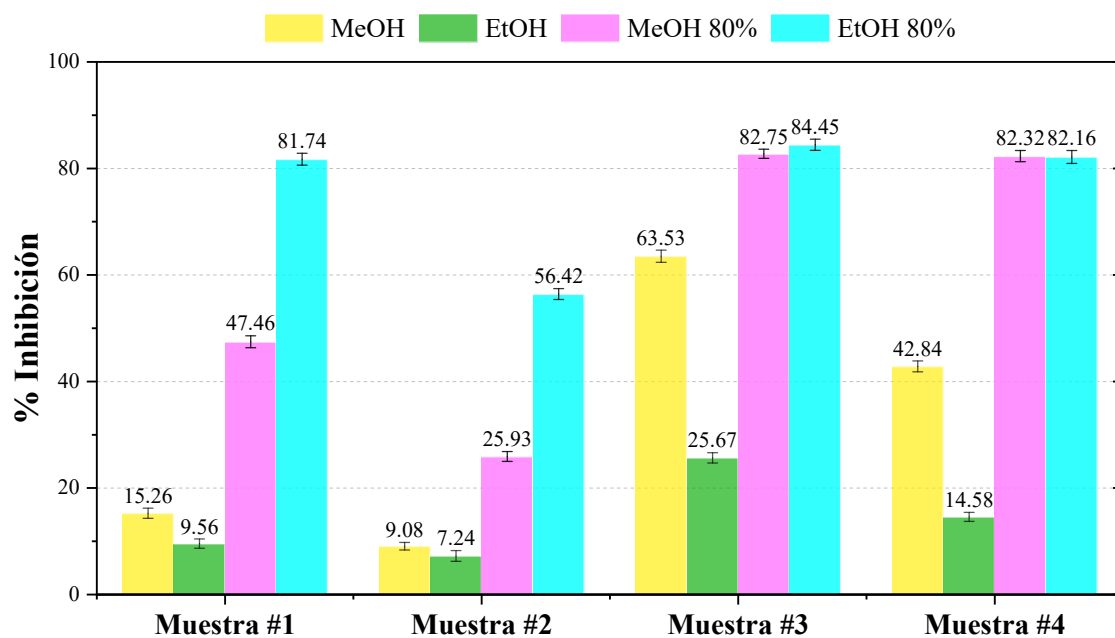
Muestra / Código	Medio de extracción	% Inhibición	CI_{50} (mg mL ⁻¹)
#1 - MpH	MeOH	15.26 ± 0.95	5.35
#2 - MpT		9.08 ± 0.72	6.13
#3 - LtH		65.53 ± 1.14	1.07
#4 - LtT		42.84 ± 1.03	1.27
#1 - MpH	EtOH	9.56 ± 0.87	5.58
#2 - MpT		7.24 ± 1.01	8.61
#3 - LtH		25.67 ± 0.96	2.64
#4 - LtT		14.58 ± 0.84	6.21
#1 - MpH	MeOH 80%	47.46 ± 1.11	2.42
#2 - MpT		25.93 ± 0.92	3.46
#3 - LtH		82.75 ± 0.86	0.37
#4 - LtT		82.32 ± 1.05	0.53
#1 - MpH	EtOH 80%	81.74 ± 1.12	2.27
#2 - MpT		56.42 ± 1.02	3.37
#3 - LtH		84.45 ± 1.04	0.37
#4 - LtT		82.16 ± 1.22	0.26

Nota. CI_{50} , miligramos del extracto por mililitro de solvente (mg mL⁻¹); CI_{50} del AG es 1.05x10⁻³ mg mL⁻¹.

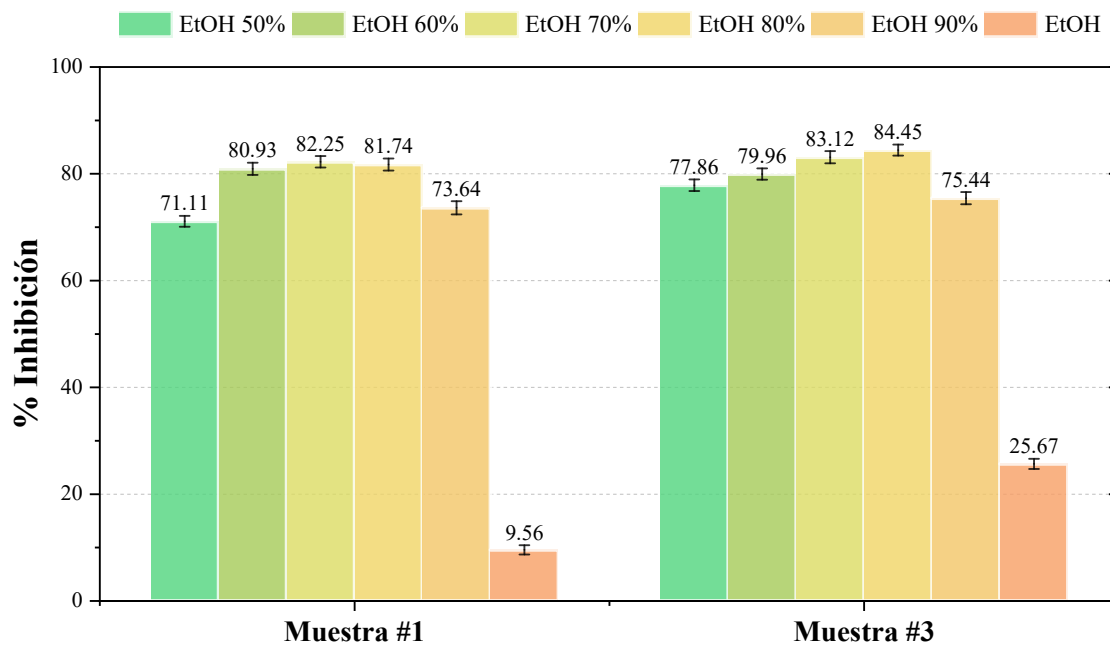
Figura 19

Diagrama de datos comparativos del porcentaje de inhibición de los extractos: a) en distintos medios de extracción, b) a distintas proporciones de etanol.

a)



b)



Acorde a los datos experimentales se infieren los siguientes resultados:

De la **Figura 19.a**, la *L. trabeculata* evidencia mayor actividad que la *M. pyrifera* en todos los medios de extracción. Con relación a las partes de las macroalgas, se observa una diferencia entre las hojas y tallos de la *M. pyrifera*, presentando las hojas mayor poder de inhibición, en el caso de la *L. trabeculata* la diferencia entre hojas y tallos es notable en los medios alcohólicos (metanol > etanol) mientras que en los hidroalcohólicos la diferencia es mínima. En todos los casos, los extractos hidroalcohólicos de ambas especies presentaron mayor actividad. Asimismo, el análisis del CI_{50} infirió mejores resultados en la *L. trabeculata* con 0.37 mg mL^{-1} y 0.26 mg mL^{-1} de las hojas y tallos respectivamente. En el caso de la *M. pyrifera*, las hojas presentaban un CI_{50} menor que los tallos; es decir, se requiere mayor cantidad de la Muestra #2 (MpT) para conseguir disminuir a la mitad la concentración inicial del DPPH. Comparando los resultados con el estándar de ácido gálico, se observó que el CI_{50} del estándar es menor que las muestras; no obstante, los extractos de las macroalgas evidenciaron actividad antioxidante en diferentes medios de extracción. En adición, debido a que los resultados fueron favorables en los extractos hidroalcohólicos, se optó por evaluar distintas proporciones del etanol, del mismo modo que en el análisis del CFT. En la **Figura 19.b** se observó que todos los extractos hidroalcohólicos presentaban un poder de inhibición mayor del 70 %, siendo los medios de EtOH 70 % y 80 % los de mayor actividad en ambas especies. La diferencia de polaridades entre los medios conlleva a extraer compuestos con afinidad a los solventes involucrados, si bien el CFT fue mayor en el EtOH 50 %, el poder de inhibición fue mejor en los medios de EtOH 70 % y 80 % debido a que se puede tener afinidad a compuestos menos polares, ciertos lípidos o pigmentos tales como esteroides, carotenoides, entre otros; los cuales aumentan la actividad antioxidante al trabajar en sinergia con otros componentes como florotaninos, compuestos fenólicos y/o metabolitos secundarios presentes en las macroalgas (Chandini et al., 2008; Kindleysides et al., 2012; Leyton et al., 2016). Por consiguiente, los análisis del CFT no guardan relación con los ensayos de DPPH para la determinación de la actividad antioxidante debido a que se debe considerar que existen distintos mecanismos de acción antioxidante de los polifenoles u otros compuestos tales como la capacidad de inhibir especies reactivas de oxígeno, capacidad de atrapar metales que desencadenan procesos oxidativos y el alto poder reductor de ciertos compuestos; asimismo, se pueden presentar distintas actividades biológicas (antifúngica, antiinflamatoria, etc.) (Olate-Gallegos et al., 2019; Tenorio-Rodríguez et al., 2019).

Considerando los resultados obtenidos en ambas especies, así como los beneficios e inconvenientes generales que conlleva la obtención de los extractos, se seleccionó como medio de extracción al EtOH 80 %.

3.2. Ensayo de DPPH de los particionamientos

Los particionamientos se realizaron a los extractos de las hojas de cada especie en el medio de EtOH 80 % debido a que se obtuvieron mejores resultados en los análisis del CFT y DPPH. Los porcentajes de inhibición de cada partición se exhiben en la **Tabla 16**.

Tabla 16

Porcentaje de Inhibición de los particionamientos obtenidos de los extractos.

Muestra / Código	% Inhibición			
	Cloroformo	Acetato de etilo	Butanol	Agua
#1 - MpH	0.97 ± 0.06	17.36 ± 0.13	52.67 ± 0.35	83.15 ± 0.41
#3 - LtH	20.84 ± 0.27	48.24 ± 0.28	69.79 ± 0.47	89.72 ± 0.53

Del mismo modo que la *L. trabeculata* tiene mayor poder de inhibición que la *M. pyrifera*, los particionamientos fueron mayores en la *L. trabeculata*. Con respecto al solvente empleado para los particionamientos, se observa un incremento del porcentaje de inhibición conforme se aumenta la polaridad, siendo mayor la fase acuosa en ambas especies. Debido a que los particionamientos presentan variación en su composición es normal evidenciar fracciones con resultados mayores al extracto crudo (Chandini et al., 2008).

Los resultados obtenidos en los rendimientos y en los ensayos del CFT y DPPH realizados a los extractos de las macroalgas difieren con otros estudios desarrollados a las mismas especies, vistas anteriormente (**Tabla 2**, pág. 9), debido a distintos factores, tales como la región y periodo de colecta, tamaño y edad del alga, salinidad, entorno, exposición solar, etc., que influyen en la producción de metabolitos secundarios u otros compuestos en las macroalgas (Kindleysides et al., 2012; Olate-Gallegos et al., 2019). Asimismo, acorde a los resultados obtenidos se infiere que los extractos de ambas especies evidencian potencial como antioxidantes naturales que podrían utilizarse en líneas de cosmética, alimentos, fármacos, etc., como otras especies de algas (Chandini et al., 2008; Y. Li et al., 2017).

B. CARACTERIZACIÓN DEL ALGINATO EXTRAÍDO

1. Rendimiento de la extracción del alginato de sodio obtenido de las especies de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*

El rendimiento del proceso de extracción se expresa como:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Masa de alginato extraído (g)}}{\text{Masa de la macroalga seca (g)}} \times 100 \%$$

En la **Tabla 17** se indican los rendimientos de extracción del alginato de sodio obtenidos de las hojas y tallos de cada macroalga parda procedentes de Paracas. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra.

Tabla 17

Rendimiento del alginato extraído de las macroalgas pardas.

Muestra	Especie	Parte	(%) Rendimiento
#1	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Hojas	18.23 ± 0.31
#2	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Tallos	17.69 ± 0.12
#3	<i>Lessonia trabeculata</i>	Hojas	26.61 ± 0.22
#4	<i>Lessonia trabeculata</i>	Tallos	27.16 ± 0.30

Como rendimiento total se considera el promedio de los rendimientos obtenidos de las hojas y tallos de cada especie. Por lo tanto, el rendimiento total para la *M. pyrifera* fue de 17.99 ± 0.36 %; mientras que para la *L. trabeculata* fue de 26.89 ± 0.39 %. Si bien los alginatos obtenidos de la *L. trabeculata* evidenciaron un mayor rendimiento, estos también presentaron una coloración más oscura que las obtenidas de la *M. pyrifera*. Estos resultados fueron similares con algunos estudios, donde el rendimiento de alginato va entre 25 – 30 % en el género de *Lessonia* (Chandia et al., 2001; Leal et al., 2008), mientras que en la *M. pyrifera* el rendimiento fluctúa entre 10 - 34 % (Gomez et al., 2009; McHugh et al., 2001), cuyas diferencias se deben a varios factores que involucran a la especie y al proceso de extracción.

2. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

2.1. Condiciones de Trabajo

Los espectros FT-IR del alginato referencial (Sigma-Aldrich) y de las muestras extraídas de las macroalgas pardas fueron obtenidas mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), empleando el equipo IRPrestige 21 – Shimadzu, en el rango de 600 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} (20 scans/muestra). El análisis se realizó en el laboratorio del Grupo de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados (GISMA), Facultad de Ciencias, UNI. Los datos obtenidos fueron graficados con el programa OriginPro 2018.

2.2. Características y análisis de los espectros

En la **Figura 20** se presenta el espectro FT-IR del alginato referencial, en el cual se identificaron las siguientes señales:

En la región entre los 3600 a 2500 cm^{-1} se observó una banda ancha a 3242 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del grupo hidroxilo (-O-H) y una señal cercana y débil a 2922 cm^{-1} atribuido a la vibración de estiramiento del enlace C-H, (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011; Hong et al., 2021). En la región del doble enlace, alrededor de los 1800 a 1500 cm^{-1} , se percibe una señal a 1588 cm^{-1} asignado a la vibración de estiramiento asimétrico del carboxilato (O-C-O). En la región de simetría, entre los 1500 a 1000 cm^{-1} , se perciben múltiples vibraciones por lo que se tiene una región poblada debido a la superposición de las señales, entre estas, se tiene a 1407 cm^{-1} la vibración de deformación del enlace C-OH con contribución de la vibración de estiramiento simétrico del grupo carboxilato (O-C-O) (Belattmania et al., 2020; Leal et al., 2008), próxima a esta señal se tiene una banda débil a 1298 cm^{-1} correspondiente a la vibración de deformación de los enlaces C-C-H y O-C-H. Las señales cercanas a 1167 cm^{-1} , 1124 cm^{-1} y 1086 cm^{-1} se les puede atribuir las vibraciones de estiramiento de los enlaces C-O y C-C del anillo piranosa (Nikonenko et al., 2000). La banda fuerte a 1020 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento del C-O del enlace glucosídico (C-O-C)(Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011; Shanura Fernando et al., 2017). En la región anomérica o huella digital (950 a 700 cm^{-1}) se tiene una señal a 943 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del C-O en los residuos de ácidos urónicos y a 884 cm^{-1} referido a la vibración de deformación del $\text{C}_1\text{-H}$ en

el residuo del ácido β -manurónico (Chandía et al., 2004; Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011; Helmiyati & M Aprilliza, 2017; Leal et al., 2008).

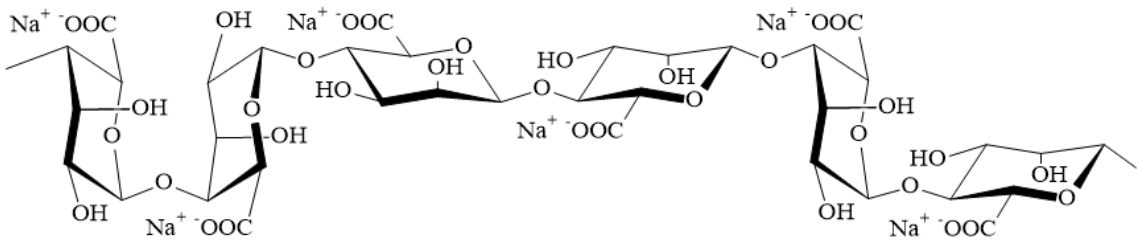
En la **Tabla 18** se indican las señales obtenidas en los espectros del alginato referencial y de los alginatos extraídos de las hojas y tallos de las especies de *Macrocystis pyrifera* (Muestra #1 y #2) y *Lessonia trabeculata* (Muestra #3 y #4) respectivamente.

Tabla 18

Señales características en los espectros de FT-IR de los alginatos extraídos.

Alginato*	Número de onda (cm ⁻¹)				Asignación
	#1	#2	#3	#4	
3242	3240	3239	3237	3235	Estiramiento del O-H
2922	2928	2920	2925	2930	Estiramiento del C-H
1588	1590	1589	1589	1585	E. asimétrico del O-C-O
1407	1410	1408	1406	1408	Deformación del C-OH, E. simétrico del O-C-O
1298	1312	1304	1295	1314	Deformación C-C-H y O-C-H
1167	1164	1167	1168	1166	E. del C-O y C-C (anillo piranosa)
1124	1122	1123	1120	1123	E. del C-O (anillo piranosa)
1086	1080	1080	1080	1080	E. del C-O y C-C (anillo piranosa)
1020	1022	1022	1022	1020	Estiramiento del C-O-C
943	945	945	943	946	E. del C-O en el ácido urónico
884	878	881	884	875	D. del C ₁ -H en el ácido β -manurónico

Alginato de Sodio

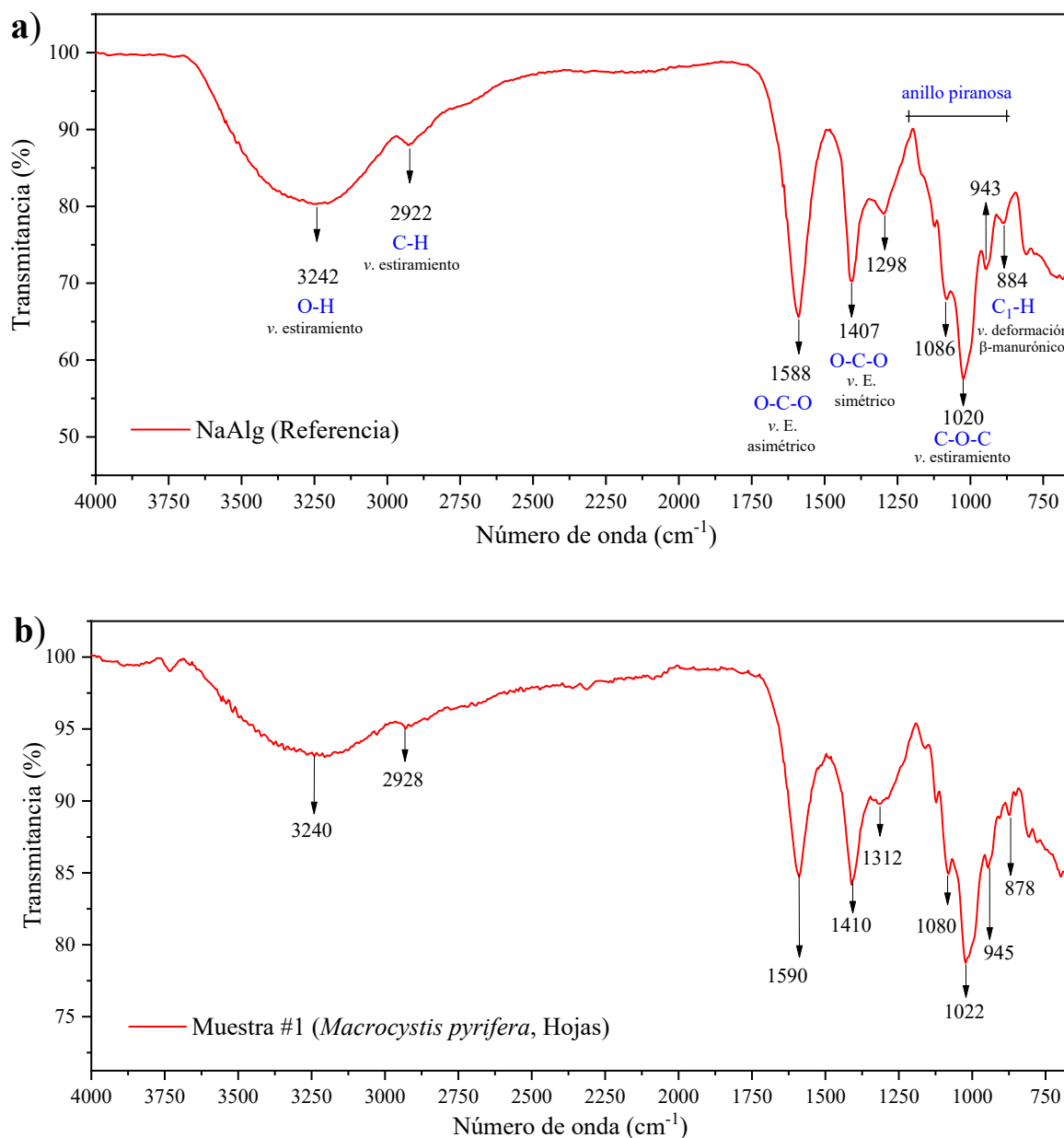


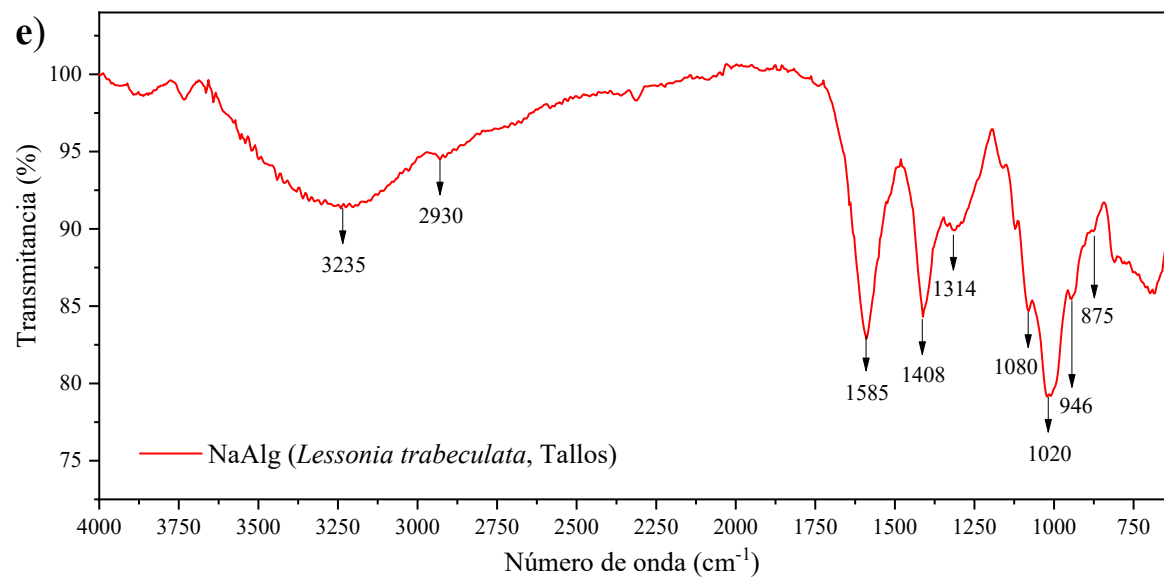
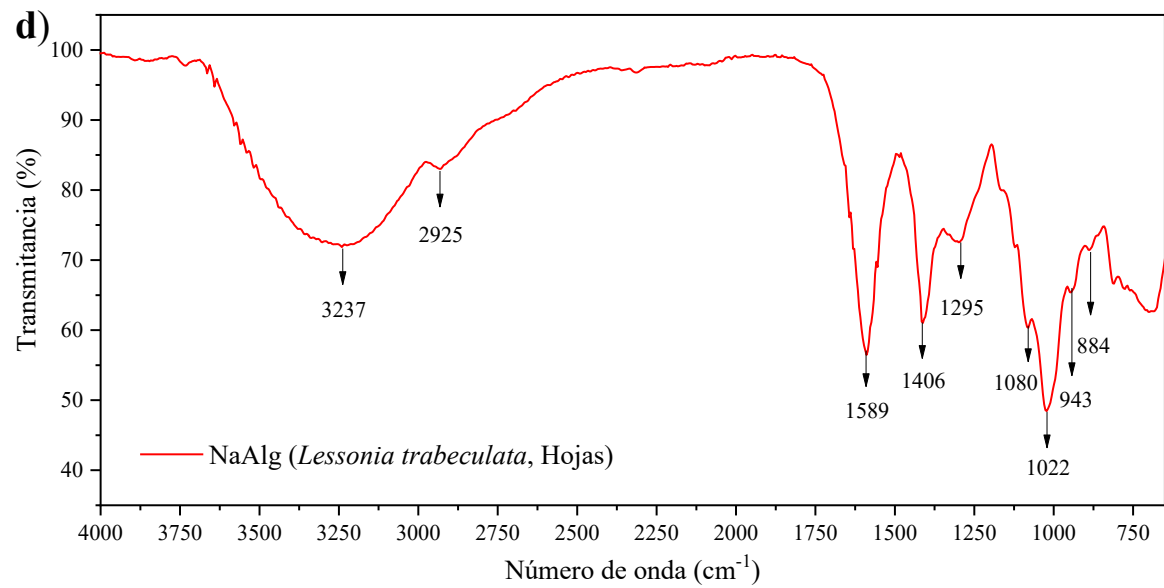
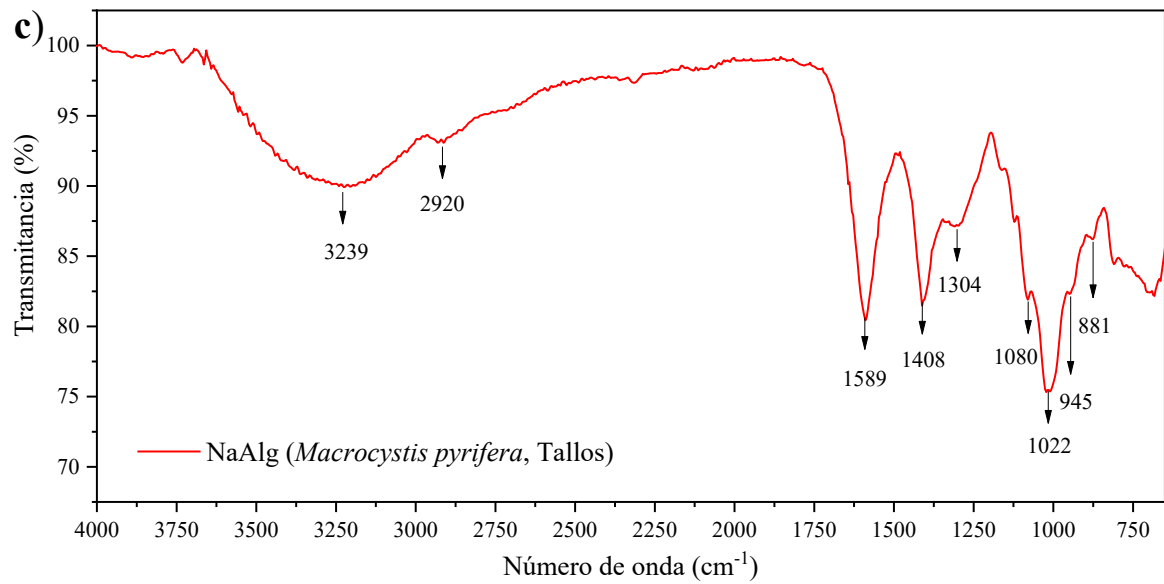
Nota. (*) Alginato Sigma – Aldrich; E. = Estiramiento; D. = Deformación.

A continuación, se muestran los espectros FT-IR del alginato referencial y de todas las muestras extraídas de las macroalgas pardas.

Figura 20

*Espectro FT-IR (600 - 4000 cm^{-1}): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la *M. pyrifera* (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la *M. pyrifera* (Muestra #2); d) alginato extraído de las hojas de la *L. trabeculata* (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la *L. trabeculata* (Muestra #4).*





En base a las señales características del espectro FT-IR del alginato referencial y de los registrados en la literatura, estos guardan relación con los valores obtenidos en los espectros FT-IR de las muestras extraídas de las macroalgas de *M. pyrifera* y *L. trabeculata*; por consiguiente, los resultados corresponden con lo esperado al alginato de sodio.

3. Termogravimetría/Termogravimetría derivativa (TGA/DTG)

3.1. Condiciones de Trabajo

El análisis termogravimétrico fue realizado en el equipo Simultaneous Thermal Analyzer STA – 600 Perkin Elmer. Se trabajó en el rango de 50 °C a 800 °C con un flujo de calentamiento de 10 °C min⁻¹, en atmosfera inerte (N₂) con un flujo de 30 mL min⁻¹. El análisis se realizó en el laboratorio del grupo de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias, UNI. Los datos obtenidos del TGA/DTG fueron procesados con el programa OriginPro 2018.

3.2. Características y análisis de los termogramas

El análisis termogravimétrico permite estudiar la estabilidad térmica del alginato de sodio, en donde se puede evidenciar los procesos de deshidratación, descomposición - degradación, formación de carbonato de sodio y el residuo correspondiente. En la **Tabla 19** se presentan los porcentajes de pérdida de peso de cada proceso obtenido en los termogramas para el alginato referencial y los alginatos extraídos.

Tabla 19

Resultados de la termogravimetría (TGA) en atmósfera inerte de los alginatos.

Proceso	ΔT (°C)	Pérdida de Peso (%)				
		Alginato*	#1	#2	#3	#4
Deshidratación	25 – 187	11.67	15.18	14.08	17.51	16.92
Descomposición	187 – 560	50.51	46.06	48.70	49.75	47.96
Formación del Na₂CO₃	560 – 800	11.10	10.64	10.91	8.54	9.88
Residuo	~800	26.72	28.12	26.31	24.20	25.24

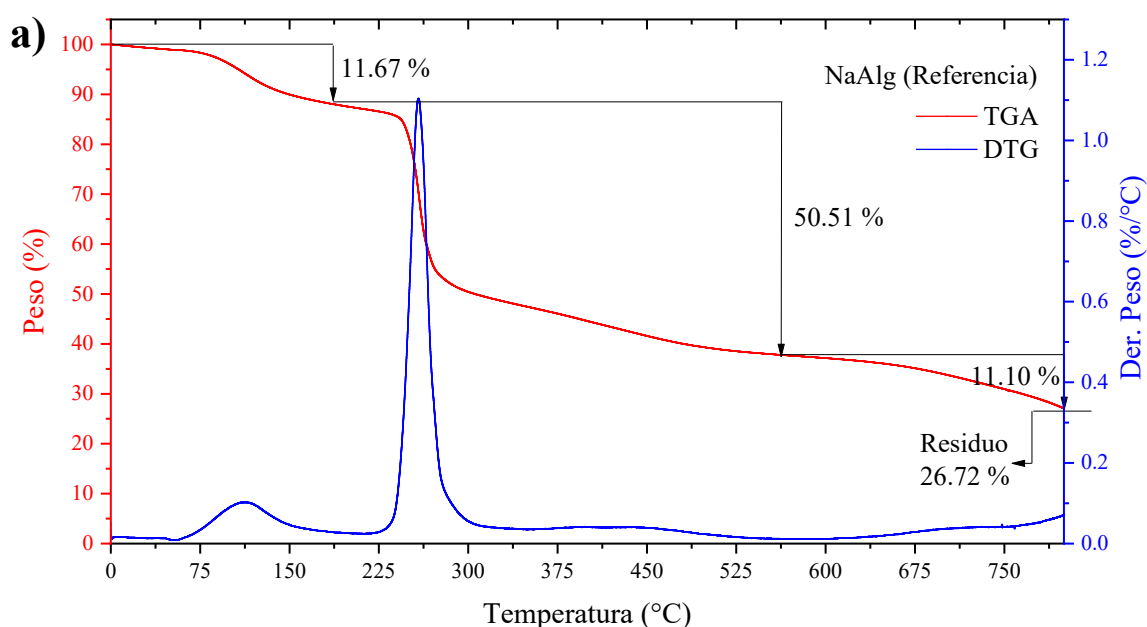
Nota. (*) Alginato Referencial, Sigma-Aldrich.

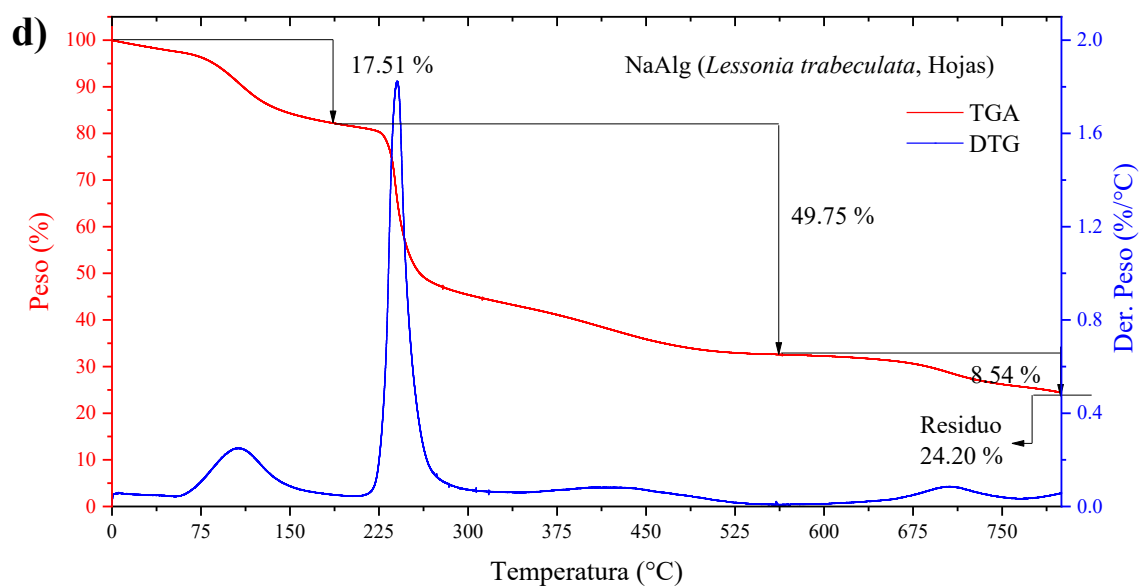
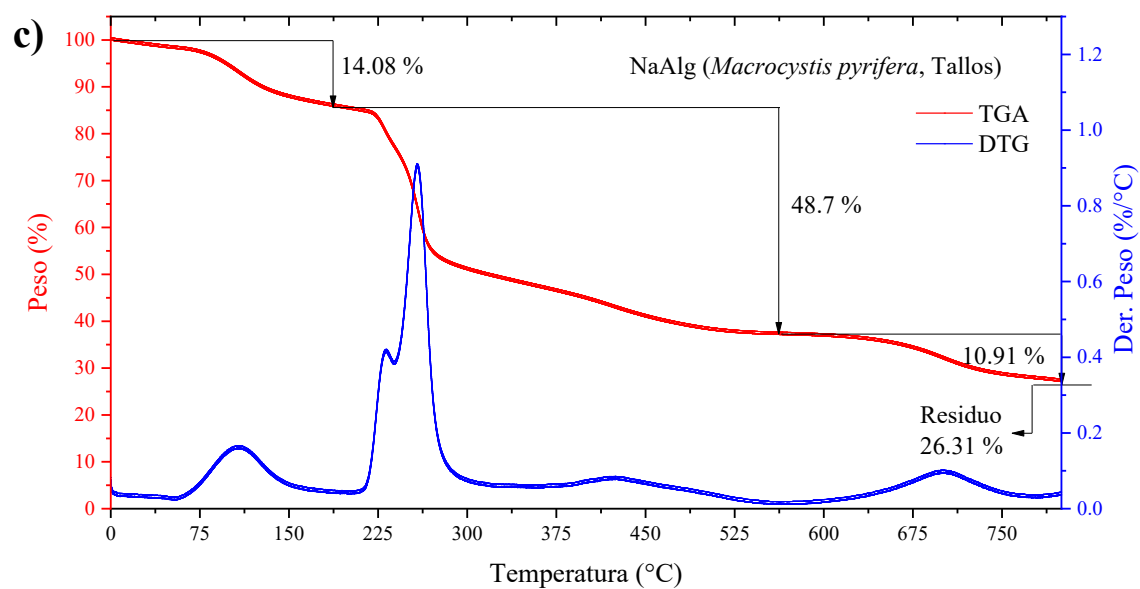
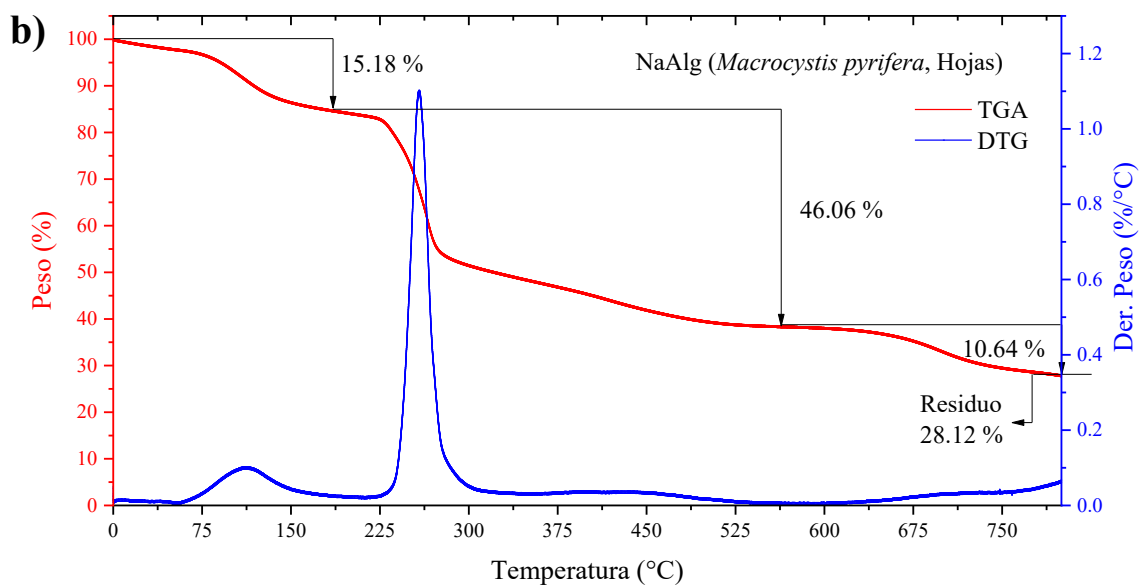
Por el análisis termogravimétrico de las muestras se observaron 3 intervalos de temperatura en los termogramas. El primer intervalo va entre los 25 a 187 °C en donde ocurre la deshidratación con una pérdida de peso alrededor del 11.67% a 17.51%. Como el alginato contiene en su estructura grupos hidroxilos (-OH) y carboxilato (-COO⁻) presentará afinidad a las moléculas del agua; por ello, a la primera pérdida de peso se le atribuye la liberación del agua (Giz et al., 2020; Russo et al., 2007; Soares et al., 2004). El segundo intervalo va alrededor de los 187 a 560 °C, en el cual se aprecia la mayor pérdida de peso entre los 46.06% a 50.51% debido a la descomposición y/o degradación de la cadena polimérica y a la fragmentación de sus monómeros (Kragovic et al., 2016; Swamy et al., 2010). El tercer intervalo va desde los 560 °C hasta los 800 °C, en donde la descomposición del material continúa hasta su transformación a carbonato de sodio (Kragovic et al., 2016; Siddaramaiah et al., 2008), presentándose una pérdida de peso alrededor del 8.54% a 11.10%. Finalmente, el residuo carbonoso obtenido a los 800°C presenta un contenido alrededor del 26%.

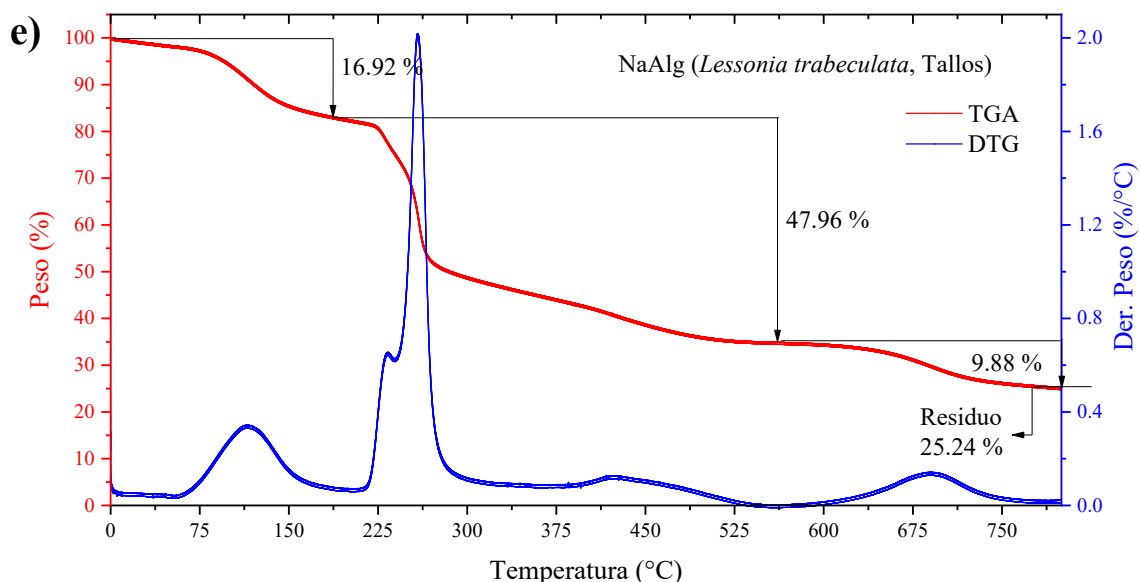
A continuación, se muestran los termogramas obtenidos de todas las muestras.

Figura 21

Termogramas (TGA/DTG), en N₂ (30 mL min⁻¹): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la *M. pyrifera* (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la *M. pyrifera* (Muestra #2); d) alginato extraído de las hojas de la *L. trabeculata* (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la *L. trabeculata* (Muestra #4).







Con respecto a la curva DTG en los termogramas de las muestras se observó dentro de los rangos de temperaturas de los procesos térmico del material, picos alrededor de los 112 °C, 255 °C y 700 °C correspondientes a la pérdida de humedad, a la fragmentación y/o ruptura del material y a la formación del carbonato respectivo (Giz et al., 2020; Kragovic et al., 2016). En el alginato referencial se observaron estos picos a los 112.76 °C, 257.50 °C y 712.39 °C (**Figura 21.a**), en la Muestra #1 a los 112.31 °C, 257.22 °C y 713.44 °C (**Figura 21.b**), en la Muestra #2 a los 107.97 °C, 258.18 °C y 700.47 °C (**Figura 21.c**), en la Muestra #3 a los 108.11 °C, 240.20 °C y 706.95 °C (**Figura 21.d**) y en la Muestra #4 se evidenció a los 113.74 °C, 258.25 °C y 692.39 °C (**Figura 21.e**).

Acorde a los datos obtenidos en los termogramas del alginato referencial y de los registrados en las bibliografías, estos guardan semejanza con los obtenidos en las muestras extraídas de las macroalgas pardas; por lo tanto, los resultados corresponden con lo esperado al alginato.

4. Difracción de Rayos X (DRX)

4.1. Condiciones de Trabajo

Los difractogramas del alginato referencial y de las muestras fueron obtenidas en un difractómetro Bruker D2 Phaser operando a un voltaje de 30 Kv, una corriente de 10 mA y una fuente de radiación de Cu k_{α} ($\lambda = 0.1542$ nm) en el rango $2\theta^{\circ}$ de 5 a 80° . El análisis se realizó en el laboratorio del grupo de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias, UNI.

4.2. Características y análisis de los difractogramas

En el análisis de difracción de rayos X para el alginato referencial se observaron tres bandas de difracción a valores aproximados de 2Θ de 13.8° , 21.9° y 39.5° , estos valores dependen de la estructura del alginato; es decir, en la diferencia entre el contenido del residuo o bloque gulurónico (G) y el residuo o bloque manurónico (M) (Fontes et al., 2013), siendo la primera señal a 13.8° originado por el plano (110) del residuo gulurónico y la segunda señal a 21.9° debido al plano (200) del residuo manurónico (Fabia et al., 2005). En adición, debido al distinto ordenamiento de los residuos G y M en la cadena polimérica se puede presentar una superposición de señales lo que se evidencia como picos anchos en forma de bandas en el difractograma; asimismo, la región amorfa situada alrededor de la tercera señal indica el desorden y las distintas orientaciones de las cadenas poliméricas que no pueden ser considerados como planos cristalinos (Fabia et al., 2005; Sundarrajan et al., 2012).

Acorde a Afzal et al., 2018, el porcentaje de cristalinidad se determinó como:

$$\text{Cristalinidad (\%)} = \frac{\text{Área cristalina}}{\text{Área total}} \times 100$$

En la **Tabla 20**, se evidenciaron los valores característicos en el alginato referencial y los alginatos obtenidos de las macroalgas pardas.

Tabla 20

Resultados de los difractogramas de los alginatos referencial y extraídos.

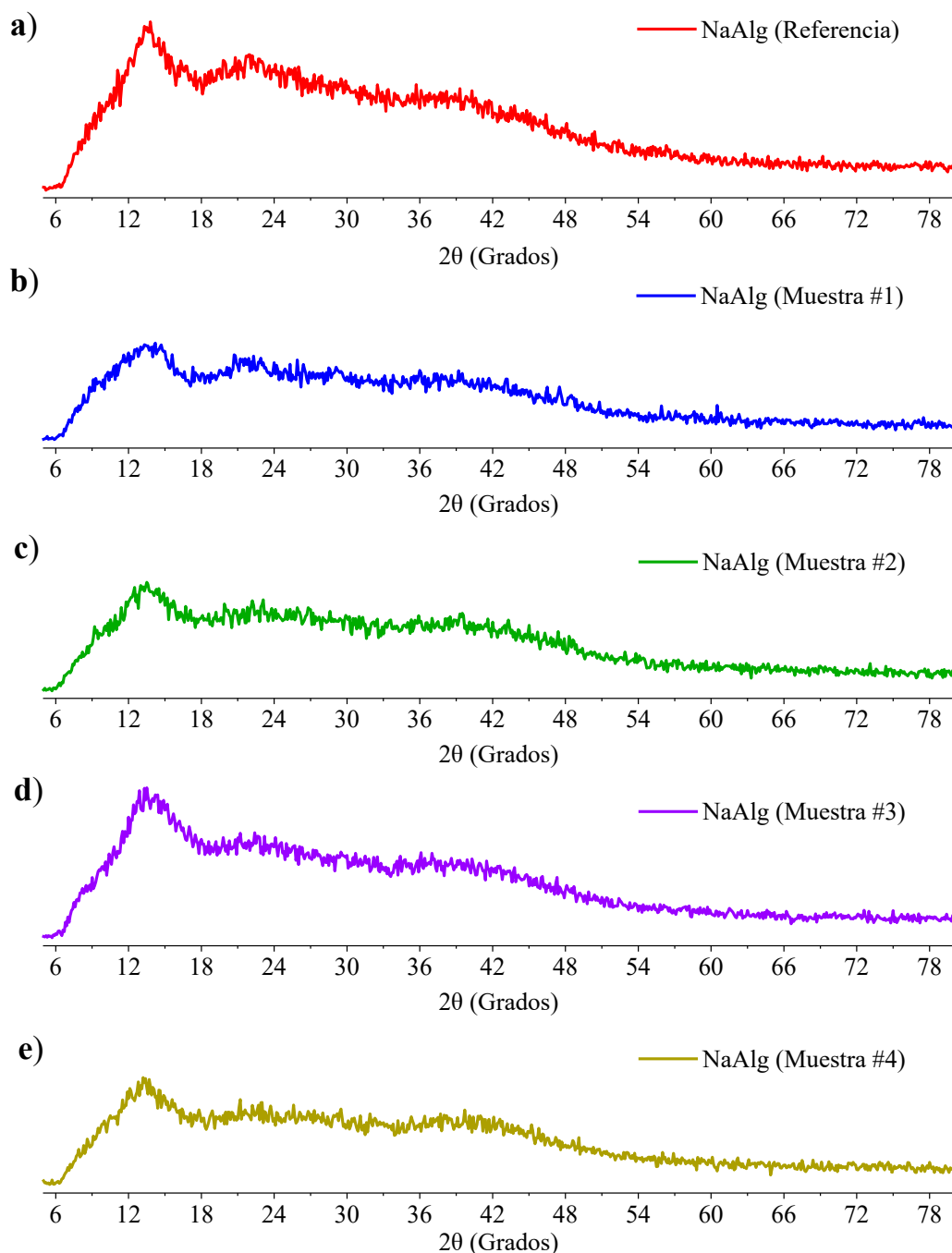
Asignación	2Θ (Grados)				
	Alginato*	#1	#2	#3	#4
Residuo Gulurónico (G)	13.8	13.9	13.4	13.5	13.4
Residuo Manurónico (M)	22.3	22.5	22.7	22.2	22.1
Halo Amorfo	39.5	39.7	39.9	39.7	39.9
Cristalinidad (%)	38.93	37.27	38.21	38.33	39.98

Nota. (*) Alginato Referencial, Sigma-Aldrich.

A continuación, se muestran los difractogramas obtenidos para las muestras.

Figura 22

Diffractogramas (DRX): a) alginato de sodio (Sigma-Aldrich); b) alginato extraído de las hojas de la M. pyrifera (Muestra #1); c) alginato extraído de los tallos de la M. pyrifera (Muestra #2); d) alginato extraído de las hojas de la L. trabeculata (Muestra #3); e) alginato extraído de los tallos de la L. trabeculata (Muestra #4).



En la estructura del alginato se tienen la conformación homopolímera referido a las secuencias de las unidades G y M como bloques, y la conformación heteropolímera correspondiente a las secuencias alternadas de los bloques GM, MG, entre otros; estas conformaciones dependen de la especie de macroalga parda y del método de extracción del alginato. Por consiguiente, teniendo en consideración el tamaño y posición de los residuos gulurónico (G) y manurónico (M) en la estructura del alginato, los difractogramas obtenidos evidenciaron ligeras variaciones. En las cadenas poliméricas, los bloques M situados en paralelo tienen una menor distancia entre sí, siendo más repetitivos a comparación de los bloques G, cuya forma geométrica tipo pinza o cavidad infiere una mayor distancia entre bloques G, considerando que la distancia repetitiva entre las cadenas poliméricas está relacionada a la periodicidad y además que las cadenas poliméricas se encuentran distribuidas al azar (Billmeyer, 2020; Fabia et al., 2005), conlleva en presentar en los difractogramas una señal más ancha y de menor intensidad alrededor de los 22° correspondiente al residuo M mientras que al residuo G se evidencia una señal menos ancha y de mayor intensidad alrededor de los 13° en ambas especies de macroalgas; asimismo, se observó una zona difusa o región del halo amorfo alrededor de los 39° (**Figura 22**). Además, en los difractogramas de los alginatos extraídos de las hojas y tallos de cada especie y del alginato referencial se observó diferencias en las intensidades debido a que también se debe considerar la proporción de los residuos M y G presentes en cada muestra.

Con respecto al porcentaje de cristalinidad, debido a la distribución y conformación del alginato, se obtuvieron valores inferiores al 50%, siendo para el alginato referencial (Sigma-Aldrich) de 38.93 %, en la Muestra #1 se obtuvo un 37.27 %, en la Muestra #2 fue un 38.21 %, en la Muestra #3 se consiguió un 38.33 % y en la Muestra #4 se alcanzó un 39.38 %, en base a los resultados obtenidos se indica que los alginatos extraídos de cada especie y del alginato referencial presentan estructuras semi-cristalinas y guardan relación con otros estudios (Alzarea et al., 2022; Helmiyati & M Aprilliza, 2017).

De los resultados obtenidos se infiere que el residuo G, el residuo M y el halo amorfo de las muestras extraídas de las hojas y tallos de cada especie, guardan ángulos de difracción semejantes, existiendo una leve variación en las intensidades; asimismo, estos resultados son comparables con lo obtenido en el alginato referencial y los reportados en las literaturas correspondiente al alginato de sodio.

5. Determinación de la Masa Molar mediante Viscosimetría Capilar

5.1. Condiciones de Trabajo

El ensayo de viscosimetría capilar se adaptó de los procedimientos de Belalia & Djelali, 2014 y Martinsen et al., 1991. A partir del alginato referencial y de las muestras extraídas se prepararon soluciones de 0.30% (p/v) y 0.15% (p/v) respectivamente en medio de cloruro de sodio; para ello, todas las muestras se disolvieron en una mínima cantidad de agua destilada a 70 °C, luego se completó con una solución de NaCl (concentración final de NaCl 0.1 M) durante 24 horas a 350 rpm y a temperatura ambiente. Después se pasó por filtros nylon 0.45 µm. A partir de la solución filtrada se obtuvieron cinco diluciones de trabajo. Este ensayo se realizó en el grupo del Laboratorio de Investigación en Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), en un equipo viscosímetro Fungilab con un capilar Cannon a 25 °C. Los datos obtenidos fueron graficados con el programa OriginPro 2018.

5.2. Cálculos y análisis del ensayo

La determinación de la masa molar promedio (M_v) de las muestras se realizó mediante viscosimetría capilar, empleando la ecuación de Mark-Howink en relación con la extrapolación de las ecuaciones de Huggins y Kraemer (Gómez-Díaz & Navaza, 2002) y las ecuaciones involucradas del análisis (**Tabla 5**, pág. 56) con el objetivo de calcular la viscosidad intrínseca $[\eta]$.

Ecuación de Mark-Howink (Masuelli & Illanes, 2014):

$$[\eta] = K M_v^\alpha$$

Donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca (mL g^{-1})

M_v : Masa molar promedio

K (mL g^{-1}) y α : constantes a las condiciones de 25 °C y en NaCl 0.1 M

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la viscosimetría capilar para el alginato referencial y los alginatos extraídos de las macroalgas pardas.

5.2.1. Alginato referencial (Sigma-Aldrich)

Tabla 21

Datos del análisis de viscosimetría capilar para el Alginato Referencial (Sigma-Aldrich).

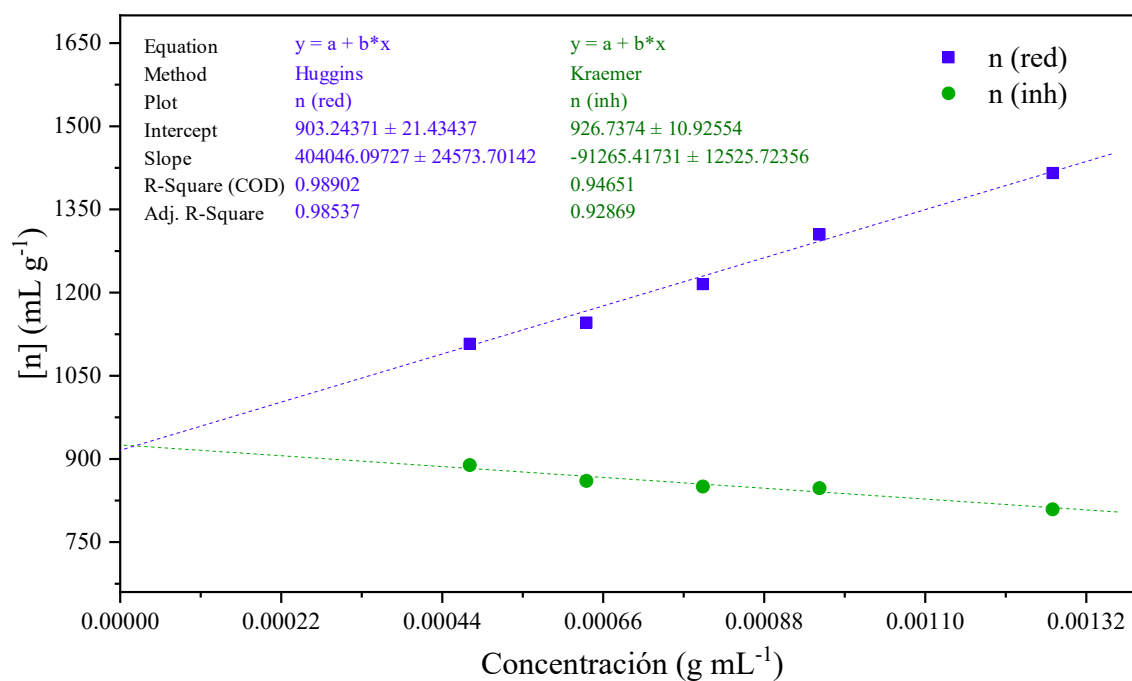
Concentración (g mL ⁻¹)	Tiempo (s)	η_r	η_{sp}	$\eta(\text{red})$	$\eta(\text{inh})$
0.0005	216.02	1.5291772	0.5291772	1107.64	889.02
0.0006	244.38	1.7299606	0.7299606	1145.93	860.44
0.0008	277.97	1.9677199	0.9677199	1215.35	850.08
0.0010	317.37	2.2466316	1.2466316	1304.69	847.13
0.0013	396.02	2.8034168	1.8034168	1415.55	809.14

Nota. Tiempo del NaCl (medio) = 141.26 s. Medida del tiempo por triplicado.

Acorde a los datos de la **Tabla 21**, se calculó la viscosidad intrínseca representado en la **Figura 23**, obtenido por los métodos de Huggins y Kraemer.

Figura 23

Viscosimetría del Alginato referencial (Sigma-Aldrich) en medio de NaCl 0.1 M a 25 °C.



Debido a que se desconoce la procedencia de la macroalga parda del que se obtuvo el alginato referencial se consideró los parámetros de Mark-Houwink a 25 °C y en medio de NaCl 0.1 M para ambas especies, los cuales se encuentran en la **Tabla 22**.

Tabla 22

Resultados de la masa molar promedio del alginato referencial acotado para cada especie.

Especie	k (ml g ⁻¹)	α	[η] (ml g ⁻¹)	M _v (g mol ⁻¹)
<i>Macrocystis pyrifera</i>	0.0073 ^a	0.92 ^a	914.99	347 861
<i>Lessonia trabeculata</i>	0.059 ^b	0.78 ^b	914.99	235 786

Nota. Parámetros Mark-Houwink (a 25 °C, NaCl 0.1M) acorde a:

(^a) Martinsen et al., 1991; (^b) Storz et al., 2009.

5.2.2. Alginato extraído de la *Macrocystis pyrifera*

Tabla 23

Datos del análisis de viscosimetría capilar para los alginatos extraídos de las hojas (Muestra #1) y tallos (Muestra #2) de la Macrocystis pyrifera.

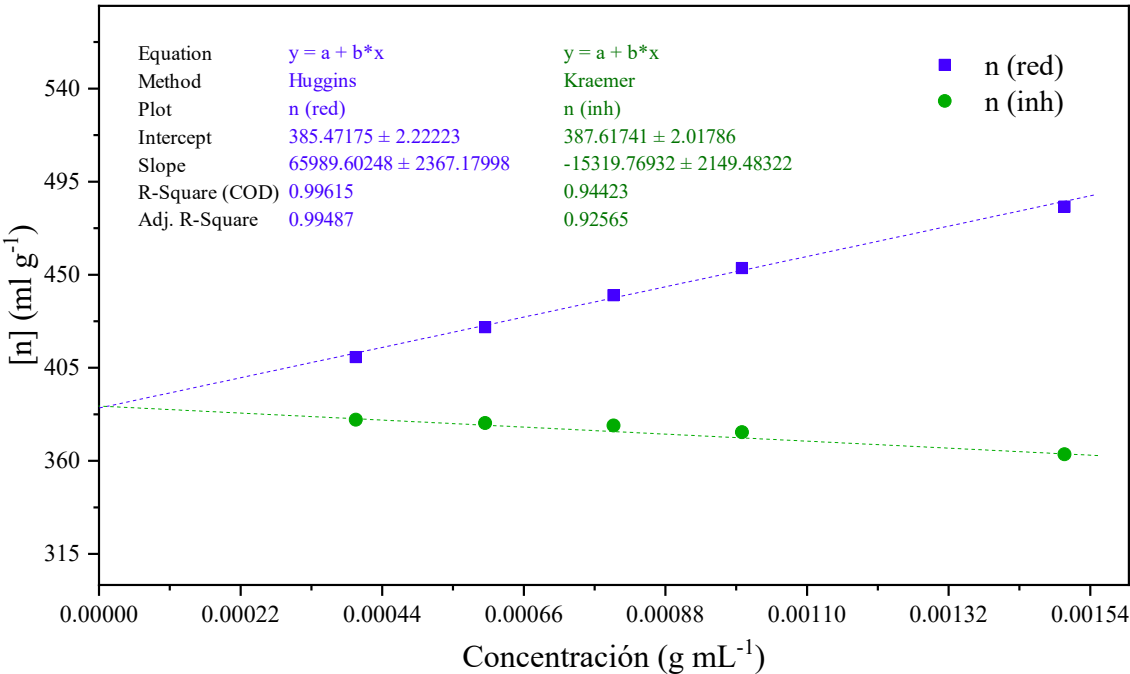
Muestra	Concentración (g mL ⁻¹)	Tiempo (s)	η_r	η_{sp}	$\eta(\text{red})$	$\eta(\text{inh})$
#1 ^a	0.0004	205.29	1.16365	0.16365	410.17	379.87
	0.0006	221.37	1.25477	0.25477	424.63	378.26
	0.0008	238.49	1.35183	0.35183	440.06	377.06
	0.0010	256.30	1.45275	0.45275	453.21	373.84
	0.0015	304.21	1.72432	0.72432	482.88	363.22
#2 ^b	0.0006	226.69	1.28603	0.28603	476.72	419.27
	0.0008	246.33	1.39743	0.39743	497.11	418.56
	0.0010	265.45	1.50587	0.50587	506.39	409.79
	0.0012	285.32	1.61864	0.61864	515.54	401.32
	0.0015	318.74	1.80823	0.80823	538.82	394.90

Nota. Tiempo del NaCl: (^a) 176.42 s; (^b) 176.27 s. Medida del tiempo por triplicado.

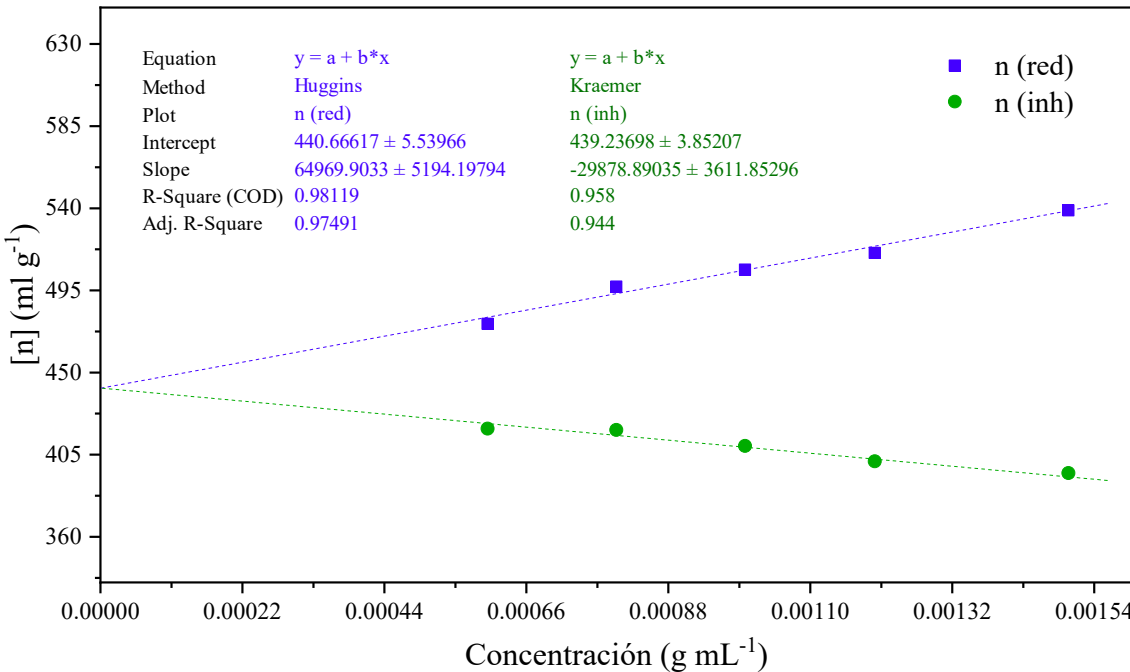
Figura 24

Determinación de la viscosidad intrínseca, mediante las ecuaciones de Huggins y Kraemer:
a) alginato extraído de las hojas de la M. pyrifera (Muestra #1); b) alginato extraído de los tallos de la M. pyrifera (Muestra #2).

a)



b)



Acorde a los datos presentados en la **Tabla 23** y en la **Figura 24.a.**, se obtuvo para la Muestra #1 los siguientes valores:

$$[\eta] = 386.54 \text{ mL g}^{-1} \quad M_v = 136\,347 \text{ g mol}^{-1}$$

De los datos de la **Tabla 23** y de la **Figura 24.b.** se obtuvo para la Muestra #2 los siguientes resultados:

$$[\eta] = 439.95 \text{ mL g}^{-1} \quad M_v = 156\,942 \text{ g mol}^{-1}$$

5.2.3. Alginato extraído de la *Lessonia trabeculata*

Tabla 24

Datos del análisis de viscosimetría capilar para los alginatos extraídos de las hojas (Muestra #3) y tallos (Muestra #4) de la Lessonia trabeculata

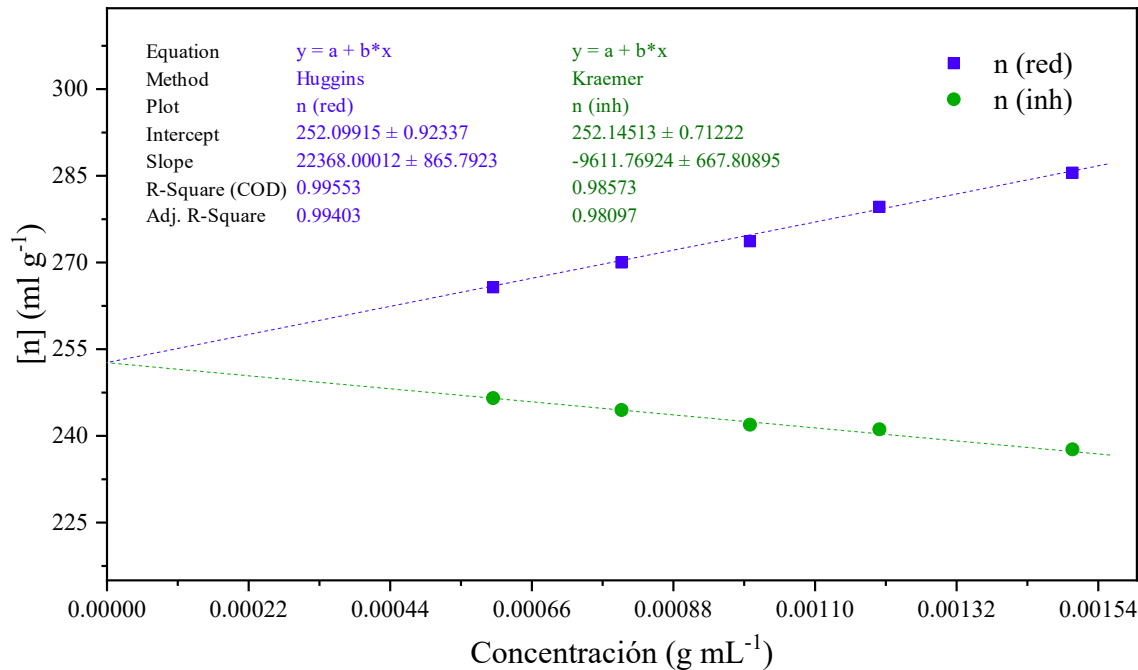
Muestra	Concentración (g mL ⁻¹)	Tiempo (s)	η_r	η_{sp}	$\eta(\text{red})$	$\eta(\text{inh})$
#3 ^a	0.0006	204.40	1.15942	0.15942	265.70	246.54
	0.0008	214.35	1.21586	0.21586	270.00	244.47
	0.0010	224.49	1.27340	0.27340	273.68	241.94
	0.0012	235.45	1.33555	0.33555	279.63	241.12
	0.0015	251.80	1.42829	0.42829	285.53	237.65
#4 ^b	0.0006	220.40	1.24965	0.24965	416.10	371.45
	0.0008	235.80	1.33694	0.33694	421.45	363.21
	0.0010	252.40	1.43109	0.43109	431.53	358.80
	0.0012	270.73	1.53499	0.53499	445.83	357.11
	0.0015	297.52	1.68692	0.68692	457.95	348.60

Nota. Tiempo del NaCl: (a) 176.29 s; (b) 176.37 s. Medida del tiempo por triplicado.

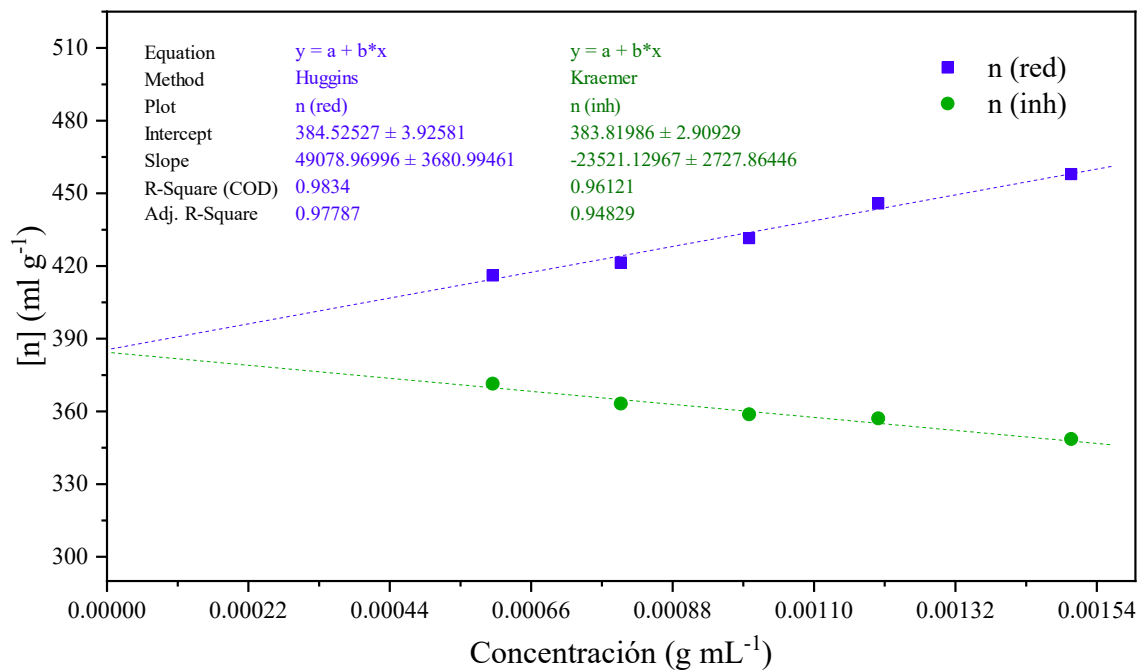
Figura 25

Determinación de la viscosidad intrínseca, mediante las ecuaciones de Huggins y Kraemer:
a) alginato extraído de las hojas de la L. trabeculata (Muestra #3); b) alginato extraído de los tallos de la L. trabeculata (Muestra #4).

a)



b)



En base a los datos de viscosimetría capilar de la **Tabla 24** y **Figura 25.a.**, se obtuvo para la Muestra #3 los valores de:

$$[\eta] = 252.12 \text{ mL g}^{-1} \quad Mv = 45\,166 \text{ g mol}^{-1}$$

Acorde a los datos de la **Tabla 24** y de la **Figura 25.b.**, se obtuvo para la Muestra #4 los siguientes resultados:

$$[\eta] = 384.17 \text{ mL g}^{-1} \quad Mv = 77\,504 \text{ g mol}^{-1}$$

A partir de los cálculos realizados y a modo comparativo se construyó la **Tabla 25**, en donde se resumen los valores obtenidos de la masa molar promedio y la viscosidad intrínseca para el alginato referencial y las muestras extraídas.

Tabla 25

Resumen de los resultados de la masa molar promedio de los alginatos.

Resultados	Alginato*	#1	#2	#3	#4
$[\eta] \text{ (mL g}^{-1}\text{)}$	914.99	386.54	439.95	252.12	384.17
$Mv \text{ (g mol}^{-1}\text{)}$	347 861 ^a 235 786 ^b	136 347	156 942	45 166	77 504

Nota. (*) Alginato Referencial, Sigma-Aldrich; (a) Para *Macrocystis pyrifera*; (b) Para *Lessonia trabeculata*.

De los resultados obtenidos, las muestras procedentes de la *M. pyrifera* (Muestra #1 y Muestra #2) presentan mayor masa molar promedio que las muestras procedentes de la *L. trabeculata* (Muestra #3 y Muestra #4); asimismo, al compararlos con el alginato referencial, se observa que las muestras extraídas tienen menores masas molares promedios, siendo el orden: Alginato referencial > Muestra #2 > Muestra #1 > Muestra #4 > Muestra #3; si bien las macroalgas pardas fueron recolectadas de un mismo lugar, las características físicas entre estas son distintas, la *L. trabeculata* tiene un cuerpo más grueso y rígido a comparación de la *M. pyrifera* que en adición presenta bulbos o aerocistos en su constitución. En ambas especies las muestras obtenidas de los tallos presentaron mayor masa molar; sin embargo, en el caso de la *L. trabeculata* la diferencia entre hojas y tallos fue mayor, esto puede deberse

a que además de los tallos se consideró también las ramas de este, siendo así un solo grupo por lo que influye en la masa molar. Otra consideración, es el hecho de que los tallos de la *L. trabeculata* no fue molida uniformemente debido a la rigidez del material por lo que puede influir en los resultados, siendo la diferencia más marcada entre las especies de macroalgas. Con respecto a la comparación con el alginato referencial, se debe considerar que se desconoce la procedencia del cual se extrajo el alginato, por lo general son mezclas de especies, lo que permite tener variación en la viscosidad y masa molar del material que van acorde a la utilidad o al consumidor, por ello la notable diferencia.

6. Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN¹H)

6.1. Condiciones de Trabajo

Los espectros RMN¹H del alginato referencial y de las muestras extraídas se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Ascend (11.75 T) Avance III HD a una frecuencia de 500 MHz equipado con una criosonda Bruker CP TCI 500S1 H-C/N-D-05-Z.

El tratamiento de las muestras se realizó acorde a la norma (ASTM F2259-10, 2012). A partir de 100 mg de cada muestra se preparó una solución al 0.1 % (p/v); para ello, se disolvió en 100 mL de agua destilada, en un baño maría a 100 °C, luego se ajustó el pH con HCl (0.1 M) hasta un pH de 5.6 y se dejó agitar por 1 hora, de ahí nuevamente se ajustó el pH hasta un pH de 3.8 y se dejó agitar por 30 minutos más. Transcurrido el tiempo, se ajustó el pH con NaOH (0.1 M) a pH 7 u 8, luego las muestras fueron liofilizadas. Del producto liofilizado se pesó aproximadamente 12 mg y se disolvió con 1 mL de D₂O (al 99.9 %), luego se volvió a liofilizar. Finalmente, se disolvió con aproximadamente 1.2 mL de D₂O en los tubos de RMN y se agregó 20 µL de ácido trimetilsililpropanoico (TSP, 3 mM). La temperatura de trabajo fue de 70 °C y previamente se calibró para un ancho de pulso de 90°.

El desarrollo de esta caracterización se realizó en los ambientes del laboratorio de Química - CERMN, en el departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Los datos obtenidos fueron procesados con el programa Mestrelab Research Chemistry Software Solution (Mnova6) para obtener la deconvolución de cada espectro en la zona de interés (desplazamiento químico aproximado entre 4.30 a 5.30 ppm). Asimismo, graficados con el programa OriginPro 2018.

Acorde a los resultados de viscosimetría capilar y del análisis de actividad antioxidante las hojas evidenciaron mejores resultados, por consiguiente, el análisis de RMN¹H se realizó solo para las hojas de cada especie (Muestra #1 y Muestra #3).

6.2. Características, cálculos y análisis de los espectros

Para el análisis de RMN¹H del alginato fue necesario un pretratamiento que consistía en la despolimerización del polímero mediante una hidrólisis parcial por etapas con ácido clorhídrico 0.1 M, de esta manera se reduce el peso molecular y es factible de analizar; sin embargo, es necesario evitar la hidrólisis completa debido a que puede generar la epimerización del material y evidenciar una relación de M/G errónea. Asimismo, la temperatura con la que se da las mediciones debe ser elevada, en este caso fue a 70 °C, con la finalidad de reducir la viscosidad de la muestra, obteniéndose señales más estrechas y alejando la resonancia del agua de la zona de interés (Jensen et al., 2015).

En la **Figura 26** y **Figura 27** se presentan los espectros de RMN¹H del alginato referencial y de los alginatos extraídos de las macroalgas pardas respectivamente dados por los protones de las unidades del manuronato y guluronato. Para las designaciones de los hidrógenos se considera la numeración de los carbonos enlazados (ver estructura del alginato, **Figura 26**) y la asignación M y G son en referencia a la unidad manuronato (M) y guluronato (G) respectivamente.

En cada espectro se evidenció la señal del estándar interno del TSP a (δ) 0 ppm y la señal residual del solvente (D₂O) a (δ) 4.32 ppm. Con respecto al alginato, se observó los protones anoméricos del M1 y G1 a un desplazamiento químico (δ) alrededor de los 4.67 ppm y 5.06 ppm respectivamente. En comparación con las demás señales, estos hidrógenos se sitúan a un campo bajo debido a que están próximos a dos átomos de oxígeno por lo que están menos protegidos que los otros hidrógenos (Grasdalen, 1983; Llanes et al., 2011).

Acorde a Kinh et al., 2007 la señal a (δ) 4.46 ppm corresponde al hidrógeno del G5 que a comparación del G1, está en proximidad a un átomo de oxígeno. Con respecto a las otras señales la interacción entre los protones guarda la siguiente relación de los desplazamientos químicos (δ , ppm): a 3.73 (M5), 3.75 (M3), 3.91 (M4/G2), 4.03 (M2/G3) y 4.17 (G4).

A partir del RMN¹H es posible determinar la relación de los residuos de manuronato y guluronato (ratio M/G) del alginato. Para ello, se hace el análisis acorde al (ASTM F2259-10, 2012), en el rango de 4.40 a 5.20 ppm para calcular las frecuencias o fracciones de las mónadas (F_G, F_M), los dúos (F_{GG}, F_{MM}, F_{GM} = F_{MG}), las triadas (F_{GGG}, F_{MGM}, F_{GGM} = F_{MGG}) y la relación M/G correspondientes a cada muestra por medio de la relación de las áreas de cada señal. Para tener el área aproximada, es necesario ajustar las señales por medio de la deconvolución del espectro en el rango establecido. Tal como se observa en la Figura 34, se establecieron los sectores A, B1, B2, B3, B4 y C en el espectro correspondientes a los hidrógenos enlazados a los átomos de carbono 1 y 5.

En la **Tabla 26**, se presentan las asignaciones y desplazamientos químicos (δ) referidos a los picos de los hidrógenos en relación con las conformaciones que presenta las unidades G y M en la cadena del alginato, los cuales fueron comparables con la literatura.

Tabla 26

Asignación del espectro RMN¹H del alginato en el rango de (δ) 4.40 a 5.20 ppm.

Señal	Posición del H ^a	Desplazamiento Químico (δ)			
		Muestras			Referencia
		Alginato*	#1	#3	
A	G1	5.06	5.06	5.06	5.05
B1	GGM-5	4.77	4.75	4.76	4.75
B2	MGM-5	4.73	4.73	4.73	4.73
B3	MG-1	4.70	4.70	4.70	4.70
B4	MM-1	4.67	4.67	4.67	4.67
C	GG5	4.46	4.46	4.46	4.46

Nota. (a) Asignación del hidrógeno correspondiente a los carbonos 1 y 5 para las mónadas, diadas y triadas de las unidades G y M; (b) Alginato referencial, Sigma-Aldrich.

Tal como se evidencia en la **Tabla 26**, se tienen señales que guardan relación con las distintas secuencias de los residuos G y M; sin embargo, en la **Figura 26** y **Figura 27**, se observaron diferencias en las intensidades de estas señales, lo que indica que existe variación con respecto a las proporciones de las unidades G y M en cada muestra.

Figura 26

Espectro RMN¹H (500 MHz, D₂O, 70 °C) del alginato referencial (Sigma-Aldrich), con ajuste de región. Línea gris producto de la deconvolución del espectro en el rango de 4.40 a 5.20 ppm (Región A, B1, B2, B3, B4 y C). Estructura numerada del Alginato.

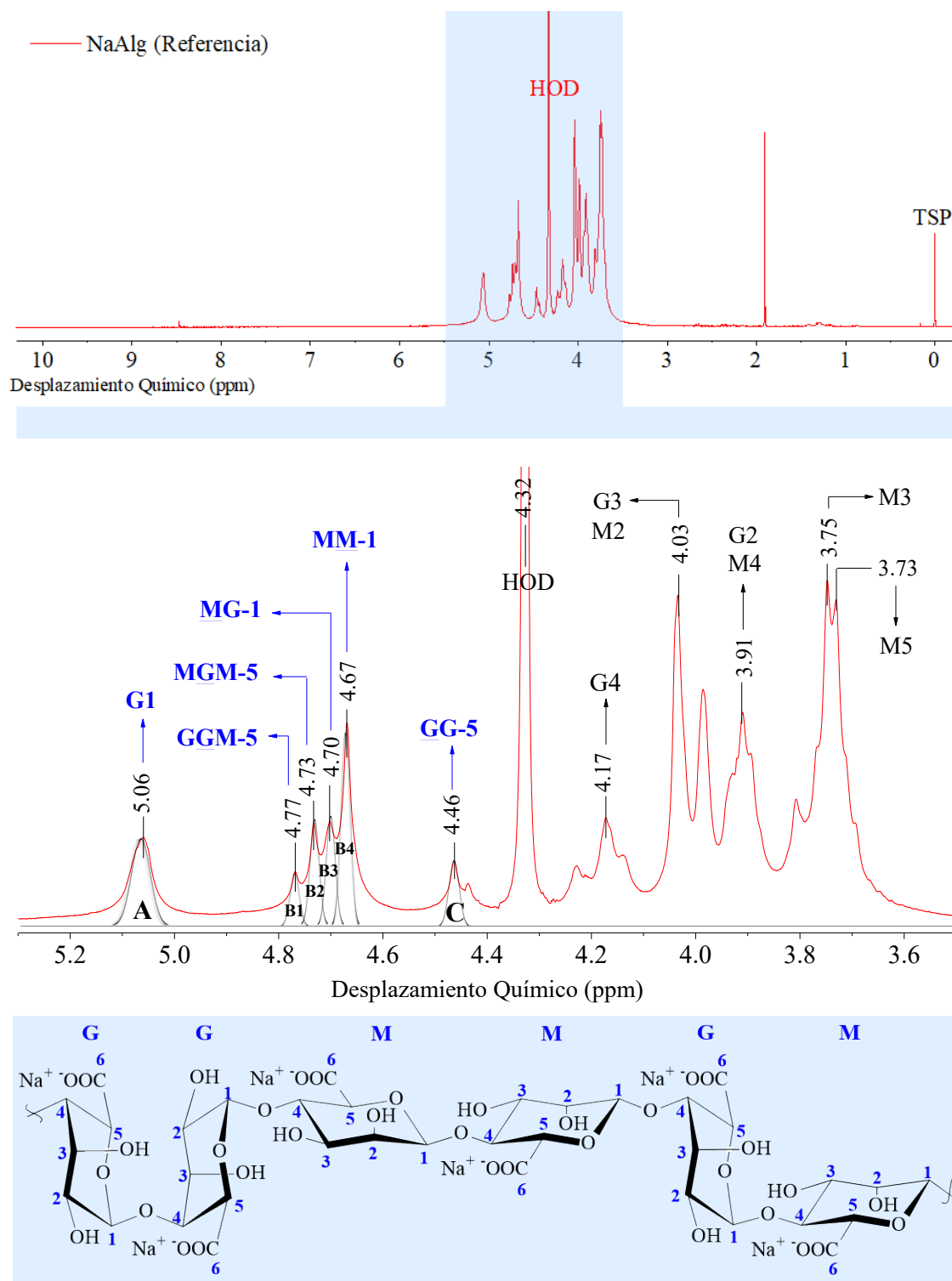
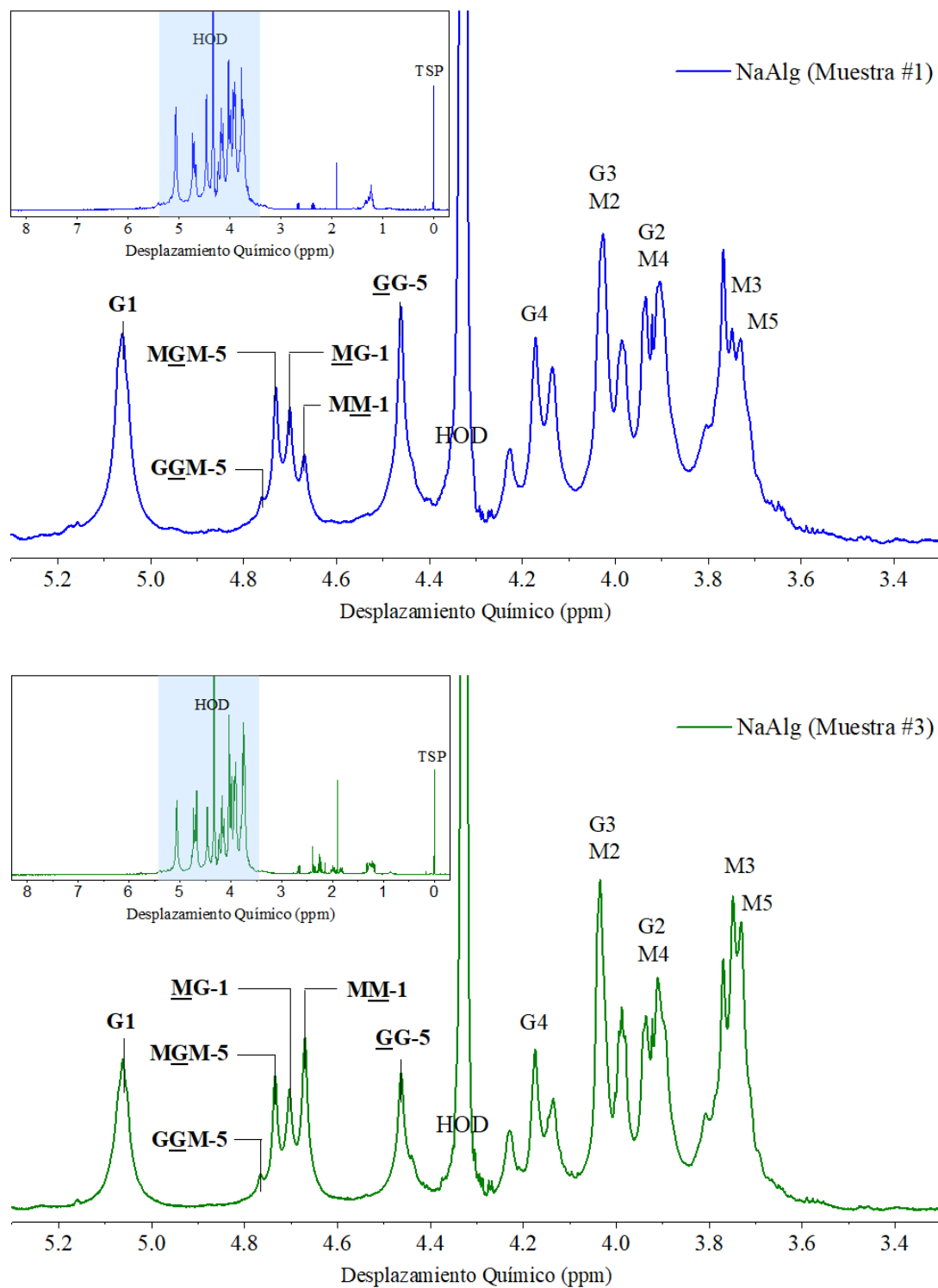


Figura 27

*Espectro RMN¹H (500 MHz, D₂O, 70 °C) del alginato extraído de las Hojas de la *M. pyrifera* (Muestra #1) y del alginato extraído de las Hojas de la *L. trabeculata* (Muestra #2), con ajuste de región en el rango de 3.40 a 5.20 ppm.*



La composición química y la secuencia en el alginato se determinó por medio de la deconvolución y al ajuste del espectro, obteniéndose las áreas de interés las cuales fueron reemplazadas en las siguientes ecuaciones (ASTM F2259-10, 2012; Grasdalen, 1983):

$$\begin{aligned} G &= 0.5(A+C+0.5(B1+B2+B3)) & M &= B4+0.5(B1+B2+B3) \\ GG &= 0.5(A+C-0.5(B1+B2+B3)) & MM &= B4 \\ MG &= GM = 0.5(B1+B2+B3) \\ GGM &= MGG = (B1)0.5(B1+B2+B3)/(B1+B2) \\ MGM &= (B2)0.5(B1+B2+B3)/(B1+B2) \\ GGG &= GG - GGM \end{aligned}$$

En la **Tabla 27** se muestran las ecuaciones para las fracciones y se resumen los cálculos realizados para las distintas secuencias de G y M en el alginato, así como la relación M/G para cada muestra.

Tabla 27

Parámetros para las fracciones (mónadas, dúos, triadas) del alginato.

Distribución	Fracciones o Frecuencias	(U.A.)		
		Alginato*	#1	#3
Mónadas	$F_G = G/(M+G)$	0.3859	0.5389	0.4774
	$F_M = M/(M+G)$	0.6141	0.4611	0.5226
Dúos	$F_{GG} = GG/(M+G)$	0.1097	0.2854	0.2212
	$F_{MM} = MM/(M+G)$	0.3379	0.2077	0.2664
	$F_{GM} = F_{MG} = MG/(M+G)$	0.2762	0.2534	0.2562
Triadas	$F_{GGG} = GGG/(M+G)$	0.0106	0.2386	0.1788
	$F_{MGM} = MGM/(M+G)$	0.1559	0.2066	0.2138
	$F_{GGM} = F_{MGG} = GGM/(M+G)$	0.1203	0.0468	0.0424
Relación	M/G	1.5914	0.8557	1.0947
Longitud (G) ^a	$N_{G>1} = (F_G - F_{MGM}) / F_{GGM}$	1.9120	7.0945	6.2155
Longitud (M) ^a	$N_M = F_M / F_{MG}$	2.2236	1.8195	2.0397

Nota. (*) Alginato referencial, Sigma-Aldrich. (a) Longitud promedio del bloque G y M.

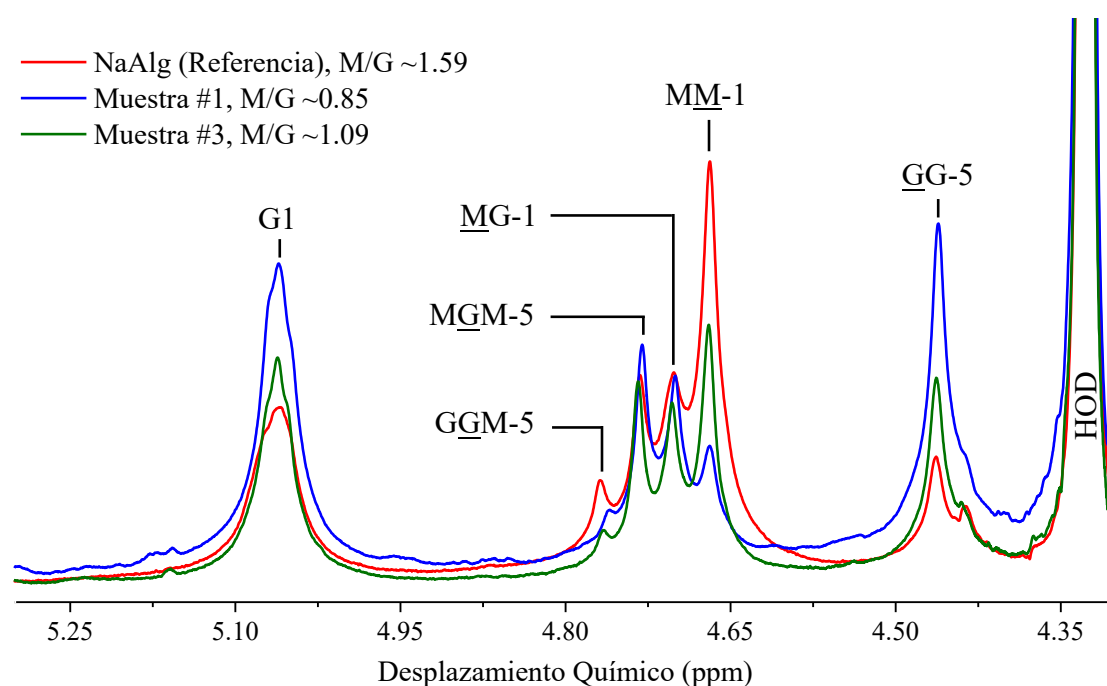
De la **Tabla 27**, se reporta que la composición del residuo guluronato y manuronato es del 38.59 % y 61.41 % para el alginato referencial (M/G, 1.59), del 53.89 % y 46.11 % para la Muestra #1 (M/G, 0.85) y del 47.74 % y 52.26 % para la Muestra #3 (M/G, 1.09) respectivamente. De estos resultados, la Muestra #1 tiene un contenido de unidades guluronato mayor que el alginato referencial y en proporción con la Muestra #3. Teniendo en consideración, que las propiedades del alginato son influenciadas por el contenido de unidades G, las características de gelación iónica serán diferentes en las muestras.

Con relación al $N_{G>1}$, la longitud homogulurónica es de 7.09 (Muestra #1), 6.21 (Muestra #3) y 1.91 (Alginato referencial). Si bien el compuesto extraído es el alginato, las diferencias del M/G y N_G se debe al proceso de extracción, especie, lugar de procedencia entre otros factores.

En la **Figura 28** se percibe las diferencias en las intensidades de las señales, en donde se observa que para una mayor proporción del G la intensidad es mayor, caso contrario se evidencia una mayor intensidad en el M.

Figura 28

Relación M/G en los espectros RMN¹H (500 MHz, D₂O, 70 °C) del alginato referencial, de la Muestra #1 (M. pyrifera) y la Muestra #3 (L. trabeculata) en el rango de 4.30 a 5.30 ppm.



7. Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C)

7.1. Condiciones de Trabajo

Los espectros RMN¹³C-CP-MAS de las muestras se consiguieron en un espectrómetro Bruker Avance III-400 MHz, operando en un campo magnético de 9.4 T (100.56 MHz) con una sonda MAS-BB-4mm y con una secuencia de pulso CPTOSS (Polarización cruzada con supresión total de banda lateral). El análisis se realizó en los ambientes del departamento de Química de la Universidade Federal São Carlos (UFSC) y los resultados fueron procesados con el software OriginPro 2018.

Para las mediciones se empleó una masa aproximada de 60 mg de cada muestra en polvo, los cuales se envasaron en rotores de zirconia con un diámetro externo de 4 mm. Como estándar de calibración se utilizó al adamantano (C₁₀H₁₆) cuya señal del carbono se observa para el CH₂ a 38.5 ppm.

7.2. Características y análisis de los espectros

El análisis de las muestras por RMN¹³C-CP-MAS permite además de identificar las señales con sus desplazamientos químicos, observar aquellos grupos químicos que son rígidos del polímero mediante la intensidad de sus señales y analizar de manera general la estructura de un polímero por medio de la amplitud de sus señales. Las intensidades de las señales son proporcionales al porcentaje de las unidades de manuronato (M) y guluronato (G), siendo la rigidez influenciada por la presencia de unidades G en la cadena del alginato que forma bloques compactos cerrados a comparación de las unidades M que indican mayor flexibilidad debido a que forman bloques planos abiertos (Brus et al., 2017). En adición, la superposición de señales refleja bandas anchas lo que infiere en la heterogeneidad estructural del alginato (secuencias de diadas y triadas del G, M y mixtas) (Brus et al., 2017; El Hariri El Nokab et al., 2022).

En la **Figura 29** se observan los espectros de RMN¹³C-CP-MAS en estado sólido del alginato, en donde se distinguen tres regiones. En la primera región se observan picos entre los (δ) 170 a 180 ppm correspondiente al átomo de carbono del carboxilato (-COO⁻) (Sperger et al., 2011) designados como G6 y M6 en referencia al átomo de carbono seis (C6) para la unidad guluronato (G) y manuronato (M) respectivamente; en adición, para la Muestra #1 y

Muestra #3 se observa en la región del carbonilo (δ , 160 – 190 ppm) picos de menor intensidad alrededor de los (δ) 160 a 170 ppm que pueden ser dados por los grupos carboxilo protonados (-COOH) (El Hariri El Nokab et al., 2022; Urbanova et al., 2019).

En la segunda región, se tienen señales superpuestas alrededor de los (δ) 101 ppm correspondientes a los átomos de carbonos anoméricos del enlace glucosídico de las unidades G1 y M1 dado por el carbono uno (C1) en la estructura del alginato. Teniendo en consideración que este carbono está enlazado a dos unidades de oxígeno se evidencia el desplazamiento químico a un campo bajo a comparación de los demás carbonos del anillo piranosa (Grasdalen et al., 1981; Salomonsen et al., 2009). Otro detalle observado en los espectros es la presencia del átomo de carbono anomérico M1 en el alginato referencial y en la Muestra #3 alrededor de los (δ) 99.5 ppm, mientras que para la Muestra #1 se tiene bien marcado el carbono G1 de mayor intensidad, indicando una mayor presencia de este.

Por último, en la tercera región se presentan señales amplias y superpuestas en el rango de los (δ) 60 a 90 ppm referido a los átomos de carbonos (C5, C4, C3 y C2) del anillo piranosa de las unidades G (G5, G4, G3 y G2) y M (M5, M4, M3 y M2). Debido a los entornos de los átomos de carbono, se observa que para el carbono cuatro (C4), este también forma parte del enlace glucosídico (C1-O-C4); sin embargo, está unido a un átomo de oxígeno a comparación del C1, por consiguiente, su señal es próxima a los (δ) 82 ppm (Grasdalen et al., 1981). En relación con las otras señales, para el caso de la Muestra #1 se observa picos intensos en los carbonos G3 y G5 a comparación de los carbonos M3 y M2, infiriendo una mayor proporción de las unidades G en el alginato, esto mismo se evidenció en la región anomérica mencionado anteriormente y en el análisis de los espectros de RMN¹H del mismo, en donde se indicó una relación M/G menor a 1, corroborando con la premisa de que se tiene mayor porcentaje de residuos G. En el caso de la Muestra #3 las señales correspondientes al M2 y M3 evidencian intensidades cercanas al G3 y G5, por lo que la proporción de las unidades M y G son próximas, esto también corrobora la relación M/G de 1 visto en el RMN¹H, indicando porcentajes de unidades M y G cercanos. A modo comparativo se observó que, para el alginato referencial, las señales M2 y M3 son más intensas que las señales G2 y G5, asimismo las señales de G3 y G4 son casi imperceptibles lo que infiere un mayor porcentaje de unidades M y lo que corresponde con la relación M/G de 1.59 indicado en el RMN¹H del alginato referencial.

La marcada diferencia del contenido de unidades G y M en cada muestra influye en la afinidad con iones divalentes y en sus propiedades gelificantes. En esta tesis, se elabora con estos alginatos películas que son reticuladas con calcio, por ende, se tendrán películas más rígidas que otras debido a la mayor proporción de unidades G presentes.

Las asignaciones y los desplazamientos químicos (δ) correspondientes a las señales de las unidades G y M del alginato se presenta en la **Tabla 28**. Asimismo, se evidencia el comparativo de los resultados con los reportados en las literaturas.

Tabla 28

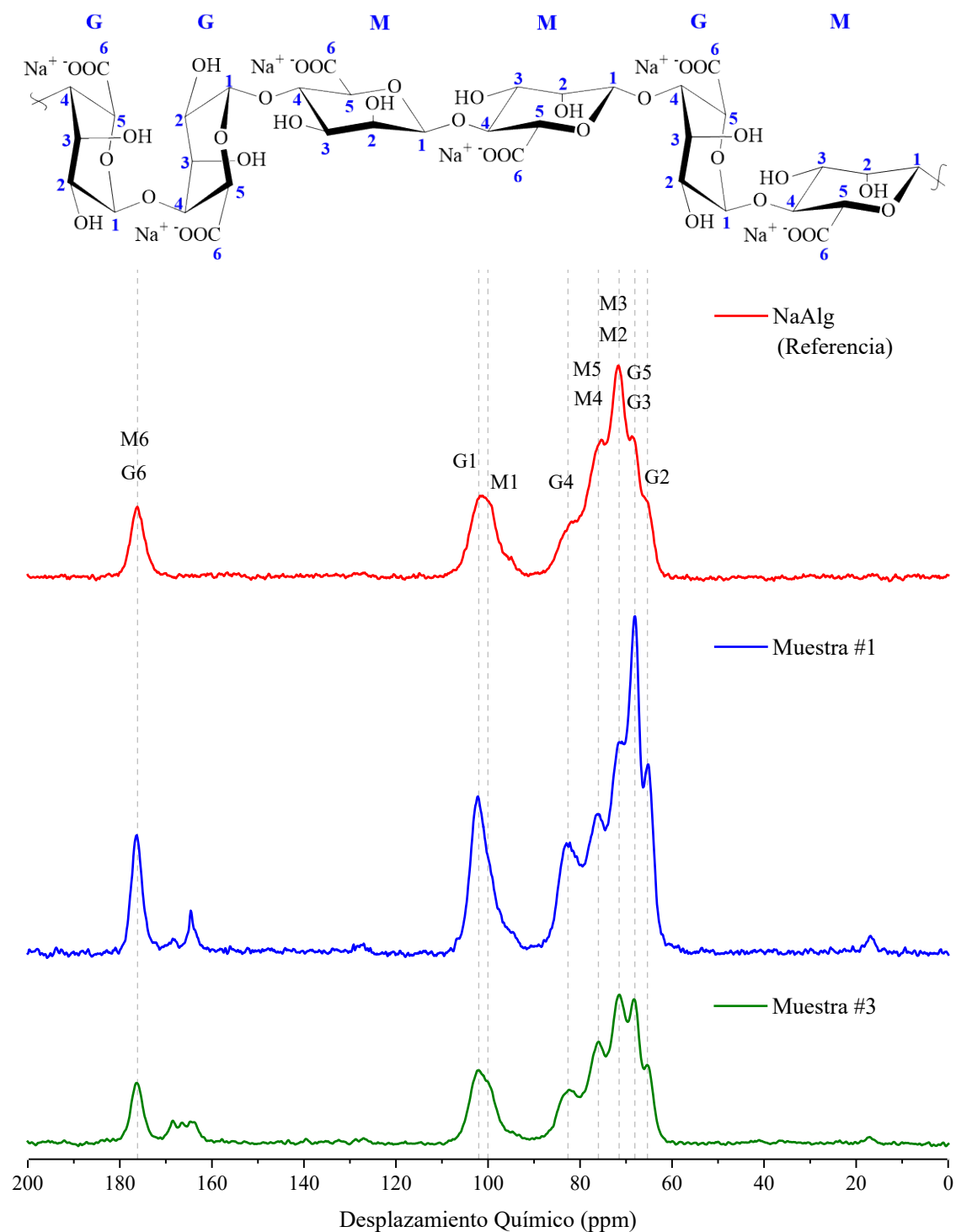
Asignación del espectro RMN¹³C-CP-MAS del alginato.

Región del Carbono	Asignación del C ^a	Desplazamiento Químico (ppm)					
		Muestras (Tesis)			Referencias		
		NaAlg ^b	#1	#3	(Salomonsen et al., 2009)	(Grasdalen et al., 1981)	
Carbonilo	G6	176.17	176.32	176.31	176.2	177.3 ^c	177.6 ^d
	M6					177.7	177.1
Anomérico	G1	101.20	102.21	102.04	102.2	103.2	102.2
	M1	99.90	-	99.65	99.5	103.8	102.8
Piranosas	G4	82.61	82.91	82.35	82.8	82.6	82.6
	M4					80.7	80.3
	M5	75.36	76.21	75.95	76.4	78.8	78.9
	M3					74.3	74.1
	M2	71.69	71.48	71.47	71.6	73.3	72.2
	G3					71.8	72.1
	G5	68.74	68.11	68.27	68.4	69.9	70.2
	G2	65.46	65.22	65.42	63.5	67.8	67.4

Nota. (a) Asignación del carbono correspondiente a la unidad manuronato (M) y unidad guluronato (G) con sus respectivos posicionamientos numéricos; (b) Alginato Referencial, Sigma-Aldrich; (c) δ , correspondiente a la secuencia GGG y GMG; (d) δ , correspondiente a la secuencia MMM y MGM.

Figura 29

*Espectro RMN¹³C-CP-MAS (100.56 MHz) del alginato referencial (Sigma-Aldrich), del alginato extraído de las Hojas de la *M. pyrifera* (Muestra #1) y del alginato extraído de las Hojas de la *L. trabeculata* (Muestra #3). Estructura enumerada para los residuos manuronato (M) y guluronato (G) del alginato.*



C. CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS DE ALGINATO

1. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

1.1. Condiciones de Trabajo

Los espectros FT-IR de las películas elaboradas con alginato y cargadas con los extractos correspondientes de las especies de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*, así como de los constituyentes de las películas fueron analizadas mediante la técnica de reflectancia total atenuada (ATR), en un equipo IRPrestige 21 – Shimadzu, con una resolución de 4 cm⁻¹ (20 scans/muestra) en el rango de 600 a 4000 cm⁻¹.

1.2. Características de los espectros

1.2.1. Componentes de las películas

Tabla 29

Señales características en los espectros FTIR de los componentes de las películas.

Muestra	Número de onda (cm ⁻¹)
AlgR	3242.1, 2922.4, 1588.5, 1407.3, 1298.5, 1167.6, 1124.3, 1080.2, 1020.3, 943.5, 884.2
AlgM	3240.2, 2928.4, 1590.5, 1410.3, 1312.8, 1164.6, 1122.6, 1080.4, 1022.5, 945.7, 878.1
AlgL	3237.4, 2925.4, 1589.6, 1406.7, 1295.3, 1168.8, 1120.3, 1080.4, 1020.7, 946.1, 875.6
ExtM	3314.2, 2921.7, 2850.9, 1637.4, 1450.4, 1399.1, 1237.4, 1074.5, 1034.9, 928.2, 870.3, 677.7
ExtL	3329.4, 2922.4, 2852.1, 1634.2, 1455.8, 1386.7, 1237.4, 1071.3, 1030.4, 928.4, 881.1, 676.3
Glicerol (G)	3292.4, 2934.5, 2878.1, 1455.3, 1419.4, 1323.6, 1210.8, 1108.4, 1030.6, 990.3, 671.1
PEG400 (P)	3448.3, 2868.1, 1457.7, 1351.8, 1293.2, 1248.6, 1094.4, 943.7
CaCl ₂	3304.4, 1639.2, 673.5

Nota. AlgR: Alginato de sodio (Sigma-Aldrich); AlgM: Alginato extraído de *M. pyrifera*; AlgL: Alginato extraído de *L. trabeculata*; ExtM: Extracto de *M. pyrifera*; ExtL: Extracto de *L. trabeculata*; G: glicerol; P: polietilenglicol (PEG400); CaCl₂: Sol. cloruro de calcio.

1.2.2. Películas elaboradas a base del alginato referencial y extraídos

Tabla 30

Señales características en los espectros FTIR de las películas elaboradas.

Muestra	Número de onda (cm ⁻¹)
AlgRGP	3271.2, 2937.3, 2879.3, 1602.2, 1409.6, 1339.7, 1296.1, 1096.1, 1027.2, 925.7, 848.4, 815.2, 670.1
AlgRGPCa	3275.5, 2936.6, 2878.8, 1596.2, 1415.6, 1337.1, 1288.2, 1096.5, 1028.2, 928.7, 847.3, 816.8, 668.2
AlgRGPExtM	3288.8, 2931.4, 2881.7, 1601.5, 1410.6, 1338.3, 1298.2, 1096.4, 1029.1, 922.3, 851.3, 815.6, 674.8
AlgRGPExtMCA	3290.5, 2936.9, 2886.1, 1629.2, 1410.4, 1337.7, 1298.1, 1101.1, 1034.2, 923.4, 849.9, 812.2, 673.8
AlgRGPExtL	3277.9, 2937.8, 2884.3, 1601.2, 1406.2, 1338.3, 1294.6, 1086.9, 1026.3, 925.3, 852.4, 813.5, 674.3
AlgRGPExtLCA	3278.2, 2931.1, 2885.7, 1591.4, 1414.5, 1339.1, 1294.3, 1087.1, 1027.5, 926.1, 881.4, 817.2, 670.8
AlgMGP	3287.2, 2937.3, 2888.6, 1607.8, 1406.3, 1353.6, 1093.6, 1028.8, 925.7, 854.4, 812.6, 672.5
AlgMGPCa	3288.1, 2938.6, 2879.3, 1596.2, 1415.6, 1337.8, 1085.3, 1024.6, 928.4, 856.3, 811.2, 668.7
AlgMGPExtM	3287.5, 2937.8, 2888.9, 1606.1, 1409.6, 1353.8, 1093.6, 1028.2, 925.6, 854.6, 812.2, 672.1
AlgMGPExtMCA	3288.9, 2938.1, 2879.3, 1600.2, 1411.5, 1338.8, 1085.7, 1029.2, 927.9, 867.6, 809.6, 667.8
AlgLGP	3272.6, 2933.9, 2876.4, 1601.8, 1407.2, 1355.7, 1088.8, 1027.5, 924.7, 848.4, 811.1, 670.3
AlgLGPCa	3278.4, 2934.1, 2878.8, 1598.1, 1415.6, 1338.7, 1084.2, 1028.1, 924.3, 849.3, 812.2, 669.1
AlgLGPExtL	3274.1, 2933.6, 2876.2, 1602.5, 1406.6, 1355.5, 1089.1, 1027.2, 924.4, 848.1, 811.3, 670.2
AlgLGPExtLCA	3277.5, 2934.3, 2878.3, 1601.1, 1414.3, 1337.7, 1086.7, 1027.9, 924.3, 848.9, 812.6, 669.7

Nota. AlgR: Alginato referencial; AlgM: Alginato extraído de *M. pyrifera*; AlgL: Alginato extraído de *L. trabeculata*; G: glicerol; P: PEG400; ExtM: Extracto de *M. pyrifera*; ExtL: Extracto de *L. trabeculata*; Ca: reticulación con Calcio.

1.3. Análisis de los espectros

Los valores reportados en las **Tablas 29 - 30** y observados en las **Figuras 29 al 33** de los espectros FTIR de las películas y sus componentes son interpretados a continuación:

La **Figura 30** muestra los espectros FTIR de las películas y sus constituyentes, en donde se evidencian las bandas típicas correspondientes del alginato en las películas, estos son alrededor de los 3271 cm^{-1} la vibración de estiramiento del enlace O-H, a 1602 cm^{-1} la vibración de estiramiento asimétrica del carboxilato (O-C-O^-), a 1409 cm^{-1} la vibración de estiramiento simétrica del O-C-O^- , a 1027 cm^{-1} la vibración de estiramiento del C-O-C, las señales entre 1200 y 1010 cm^{-1} involucra las vibraciones de estiramiento del C-C y C-O del anillo piranosa, por debajo de los 1000 cm^{-1} se tiene la vibración de estiramiento del C-O de los residuos urónicos y la vibración de deformación del enlace C-H_1 en el ácido manurónico (Gómez-Ordóñez & Rupérez, 2011; Hong et al., 2021; Leal et al., 2008; Shaari et al., 2018), indicados anteriormente en la caracterización del alginato.

Con respecto a los plastificantes, en el glicerol se observó las señales a 3292.4 cm^{-1} de la vibración del enlace O-H, a 2934.5 y 2878.1 cm^{-1} la vibración de tensión asimétrico y simétrico del enlace C-H del $-\text{CH}_2$ respectivamente, a 1455.3 y 1419.4 cm^{-1} la vibración de flexión del C-H, a 1323.6 cm^{-1} balanceo en el plano del enlace O-H, a 1210.8 cm^{-1} vibración del enlace C-C-C, a 1108.4 cm^{-1} la vibración de estiramiento del C-O en el HC-OH , a 1030.6 y 990.3 cm^{-1} la vibración de estiramiento del C-O en el $\text{CH}_2\text{-OH}$ y a 671.1 cm^{-1} el balanceo del $-\text{CH}_2-$ (Danish et al., 2017; Kachel-Jakubowska et al., 2017; Nakagawa & Oyama, 2019).

En el polietilenglicol (PEG400) se presentaron las señales a 3448.3 y 2869.1 cm^{-1} de la vibración de estiramiento del enlace O-H y C-H respectivamente, a 1457.7 y 1352.8 cm^{-1} la vibración de flexión del C-H, a 1293.2 , 1248.6 y 1094.4 cm^{-1} la vibración de estiramiento de los enlaces del C-O-H y O-H, a 943.7 cm^{-1} la vibración de flexión fuera del plano del CH (Banerjee et al., 2017; Marcos et al., 2018; Shameli et al., 2012).

Para la solución de cloruro de calcio se obtuvo picos a 3309 cm^{-1} de la vibración de estiramiento del enlace O-H del agua, además de que se tiene una influencia del hidrógeno del agua y el cloro en la red cristalina del compuesto ($\text{O-H}\cdots\text{Cl}$), a 1639.2 cm^{-1} la vibración de flexión del enlace H-O-H del agua (Karunadasa, 2019).

En relación con los extractos de *M. pyrifera* (M) y *L. trabeculata* (L) (**Figura 31**), se obtuvieron señales cercanas. En general, ambos extractos evidencian señales a 3214.2 (M) y 3237 (L) cm^{-1} por la vibración de estiramiento del enlace O-H, a 2921.7-2850.9 (M) y 2922.4-2852.1 (L) cm^{-1} la vibración de estiramiento del enlace C-H indicativo de estructuras alifáticas y/o aromáticos (Meenakshi et al., 2011; Tenorio-Rodríguez et al., 2019), a 1637.4 (M) y 1634.2 (L) cm^{-1} la vibración de estiramiento del enlace C=C, a 1450.4 (M) y 1455.8 (L) cm^{-1} la vibración del enlace C-H y flexión del enlace C-C de compuestos aromáticos (Bouzidi et al., 2008; Suresh et al., 2016; Tenorio-Rodríguez et al., 2019), a 1399.1 (M) y 1386.7 (L) cm^{-1} flexión del O-H y el estiramiento C-O en el grupo C-O-H, a 1237.4 (M) y (L) cm^{-1} estiramiento del C-O (Beratto et al., 2017; Lim et al., 2002), 1074.5 (M) y 1071.3 (L) cm^{-1} vibración del C-O-H de alcoholes secundarios, a 1034.9 (M) y 1030.4 (L) cm^{-1} estiramiento del C-O del alcohol primario (Bouzidi et al., 2008; Coates, 2000).

En cuanto a los espectros FTIR de las películas (**Figura 30 al 33**), además de las señales típicas del alginato, se confirma la presencia del glicerol debido a la presencia de las bandas alrededor de los 2934 y 2878 cm^{-1} , observándose ligeros desplazamientos que pueden ser por la interacción de enlace de hidrógeno producido entre el alginato y el glicerol (Shaari et al., 2018), igualmente para el PEG400. Otra banda más pronunciada que se observa por debajo de los 750 cm^{-1} indica también la integración del plastificante en la matriz polimérica. Asimismo, al comparar el espectro FTIR del alginato base con el plastificante se observa que en el rango de los 3400 a 3000 cm^{-1} la intensidad de la banda se ve incrementada debido a la mayor presencia de los grupos hidroxilos (-OH) que otorga el plastificante a la película. Otro detalle que se observa son los desplazamientos a frecuencias más altas de las señales de 1588 y 1022 cm^{-1} del alginato; en las películas se observan estas señales alrededor de los 1600 y 1026 cm^{-1} . Estos cambios pueden ser por la disminución en la interacción entre el agua y el alginato, en donde ahora se involucra el glicerol que tiene mayor afinidad al agua (Gao et al., 2017; Shaari et al., 2018).

En las **Figuras 31, 32 y 33** se presentan los espectros FTIR de las películas cargadas con los extractos de cada macroalga, en los cuales se observó que la vibración asimétrica y simétrica del grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) evidencian un leve desplazamiento luego del cargado con los extractos debido a que pueden producirse interacciones intermoleculares por puente de hidrógeno y/o iónicos (Aydin & Zorlu, 2022; Kadam et al., 2015; Shin et al., 2019; Wang et al., 2017). Las interacciones entre la matriz polimérica y el extracto pueden ser

producidos por los grupos hidroxilos, carboxilos y/o carbonilos entre otros grupos funcionales presentes en los compuestos de los extractos. Las macroalgas pardas contienen exclusivamente florotaninos (Gaitan-Espitia & Schmid, 2020), los cuales poseen más de un grupo hidroxilo. En adición, considerando que el alginato también tiene dos grupos hidroxilo en los residuos manurónico y gulurónico, estos también pueden interactuar con los compuestos polifenólicos de los extractos formando una red más estable (Aloui et al., 2021; Kadam et al., 2015). En los espectros FTIR de las películas también se evidenciaron señales alrededor de los 2920 y 2850 y 671 cm^{-1} que son marcados en los extractos, lo que confirma la integración del extracto en las películas.

Con respecto a la reticulación con calcio de las películas se perciben cambios en las señales correspondientes a la vibración del estiramiento asimétrico y simétrico del grupo carboxilato, la **Tabla 31** reporta las señales antes y después de la reticulación, donde se observó que en la señal alrededor de los 1602 cm^{-1} ocurre un desplazamiento a un número de onda más bajo, a 1596 cm^{-1} , mientras que para la señal a los 1409 cm^{-1} el desplazamiento va a un número de onda más alto, a 1415 cm^{-1} . Estos cambios se deben a la fuerte interacción electrostática que ocurre entre el catión divalente (Ca^{2+}) y el carboxilato (COO^-) (J. Li et al., 2016; Tong et al., 2017; Urquiza et al., 2011). Estos picos son característicos para identificar el intercambio iónico, al variar el entorno en la película se produce el intercambio de los iones de sodio por los iones de calcio, en el que se involucran cambios con el peso y tamaño; teniendo en consideración que la formación más compacta lo tienen los residuos gulurónicos (Bloques G), entonces se beneficia el posicionamiento del Ca^{2+} en la cadena polimérica lo que conlleva a un ordenamiento en el material; es así, que se observan variaciones en las señales del carboxilato (Blachechen & Petri, 2019; Giz et al., 2020; J. Li et al., 2016). Los desplazamientos en las señales del carboxilato confirman la reticulación del proceso; sin embargo, en las películas #3 y #4, la señal a 1410 cm^{-1} no evidencia cambios significativos, mientras que la señal a 1601 cm^{-1} se desplazó a 1629 cm^{-1} , en algunos casos se debe a que se produjo una reticulación incompleta (Bekin et al., 2014). En cuanto a las intensidades de las películas reticuladas se observó una disminución en las señales del carboxilato, debido a que los grupos hidroxilo y carboxilato de la matriz polimérica forman una estructura más rígida con el Ca^{2+} (de Laia et al., 2014; Larosa et al., 2018); sin embargo, la presencia de los extractos incrementa las intensidades, lo que indica una posible competencia en las interacciones con los compuestos polifenólicos del extracto y la cadena polimérica.

Tabla 31

Valores comparativos de las señales de vibración de estiramiento asimétrico y simétrico del carboxilato (-COO⁻) antes y después de la reticulación con calcio.

Nº	Componentes	Número de onda (cm ⁻¹)	
		$\nu(-\text{COO}^-)$ Asimétrico	$\nu(-\text{COO}^-)$ Simétrico
#1	AlgRGP	1602.2	1409.6
#2	AlgRGPCa	1596.2	1415.6
#3	AlgRGPExtM	1601.5	1410.6
#4	AlgRGPExtMCA	1629.2	1410.4
#5	AlgRGPExtL	1601.2	1406.2
#6	AlgRGPExtLCA	1591.4	1414.5
#7	AlgMGP	1607.8	1406.3
#8	AlgMGPCa	1596.2	1415.6
#9	AlgMGPExtM	1606.1	1409.6
#10	AlgMGPExtMCA	1600.2	1413.5
#11	AlgLGP	1601.8	1407.2
#12	AlgLGPCa	1598.1	1415.6
#13	AlgLGPExtL	1602.5	1406.6
#14	AlgLGPExtLCA	1601.1	1414.3

Nota. AlgR: Alginato referencial; AlgM: Alginato extraído de *M. pyrifera*; AlgL: Alginato extraído de *L. trabeculata*; G: glicerol; P: PEG400; ExtM: Extracto de *M. pyrifera*; ExtL: Extracto de *L. trabeculata*; Ca: reticulación con Calcio.

A continuación, se presentan los espectros FTIR de las películas a base del alginato referencial, los alginatos extraídos, los cargados con los extractos de las macroalgas, las reticulaciones con calcio, además de los otros constituyentes de las películas elaboradas.

Figura 30

Espectros FT-IR de la película de alginato, película de alginato reticulada, alginato referencial, glicerol, polietilenglicol y solución de cloruro de calcio.

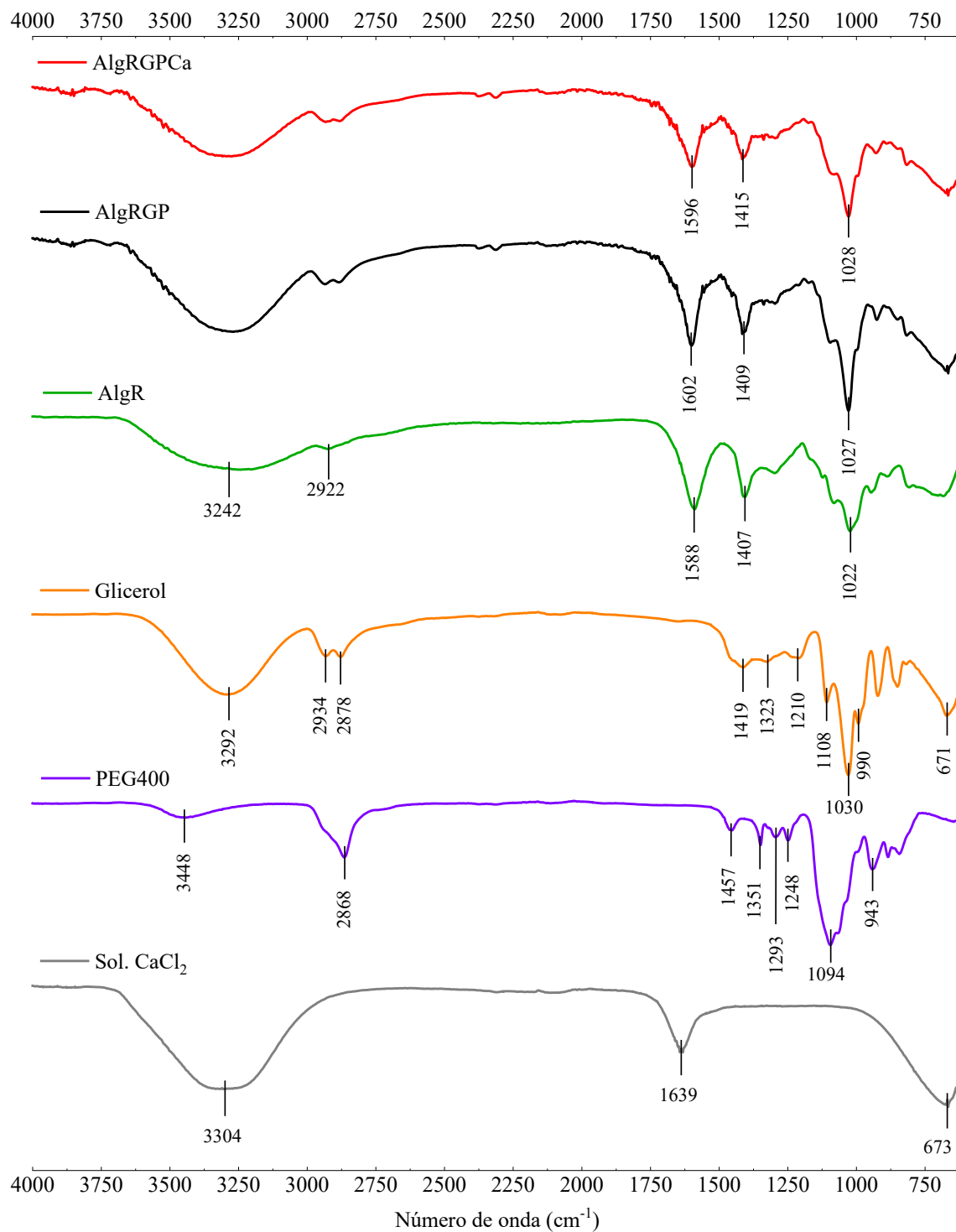


Figura 31

*Espectros FT-IR de las películas de alginato referencial, películas cargadas con los extractos, películas reticuladas, extracto de *M. pyrifera* y extracto de *L. trabeculata*.*

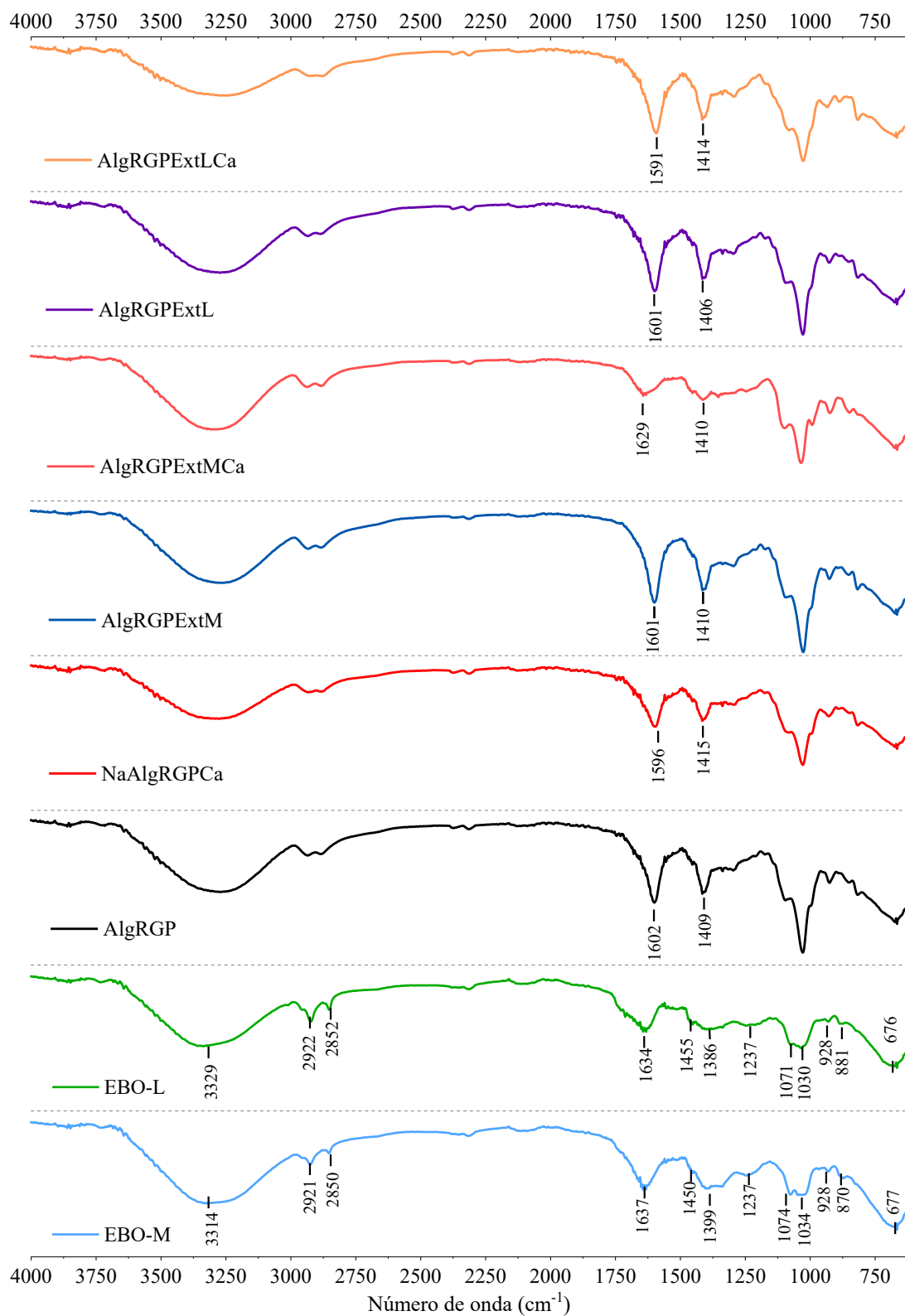


Figura 32

*Espectros FT-IR de la película a base del alginato extraído, películas cargadas con extracto, películas reticuladas, alginato extraído de *M. pyrifera* y extracto de *M. pyrifera*.*

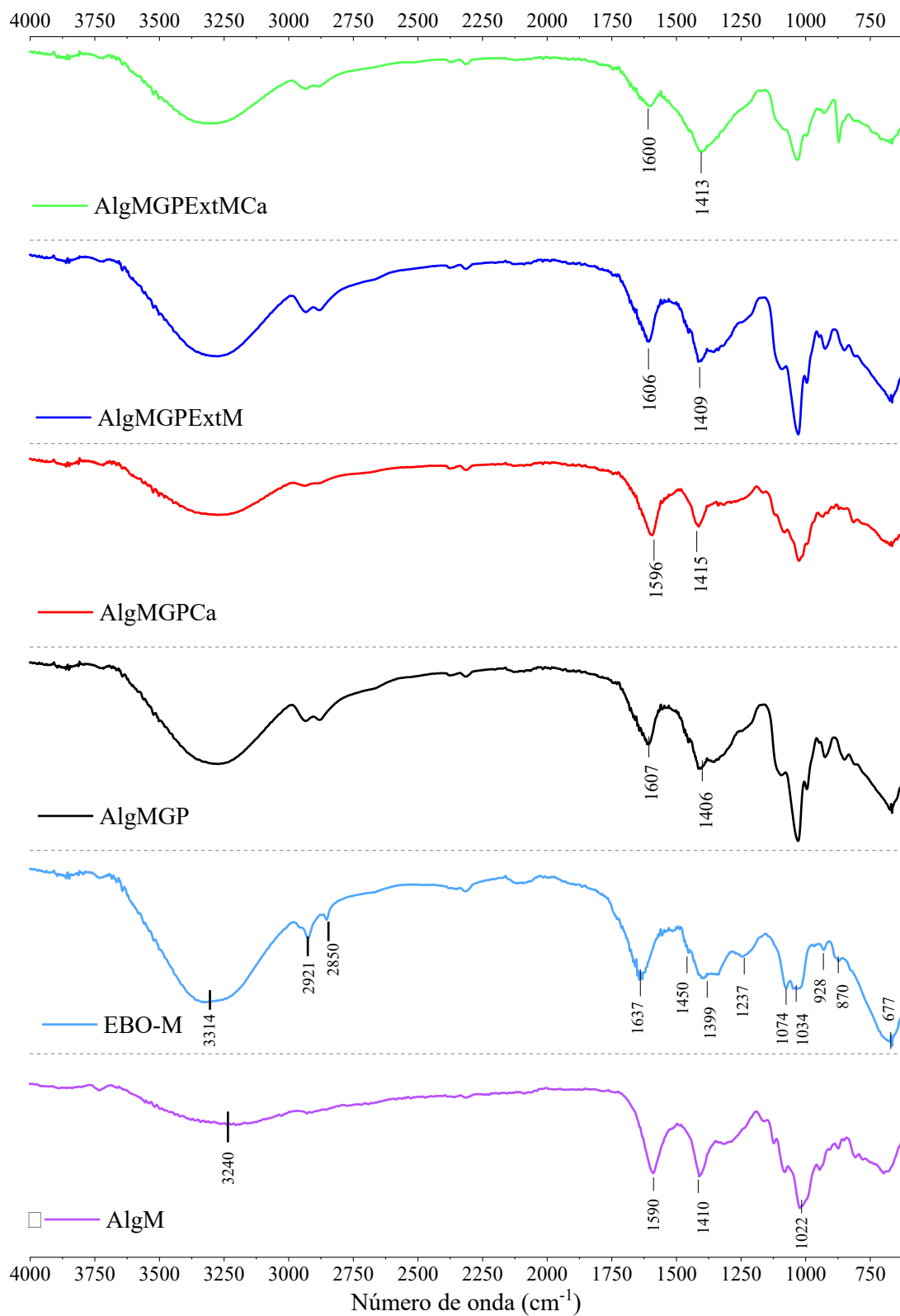
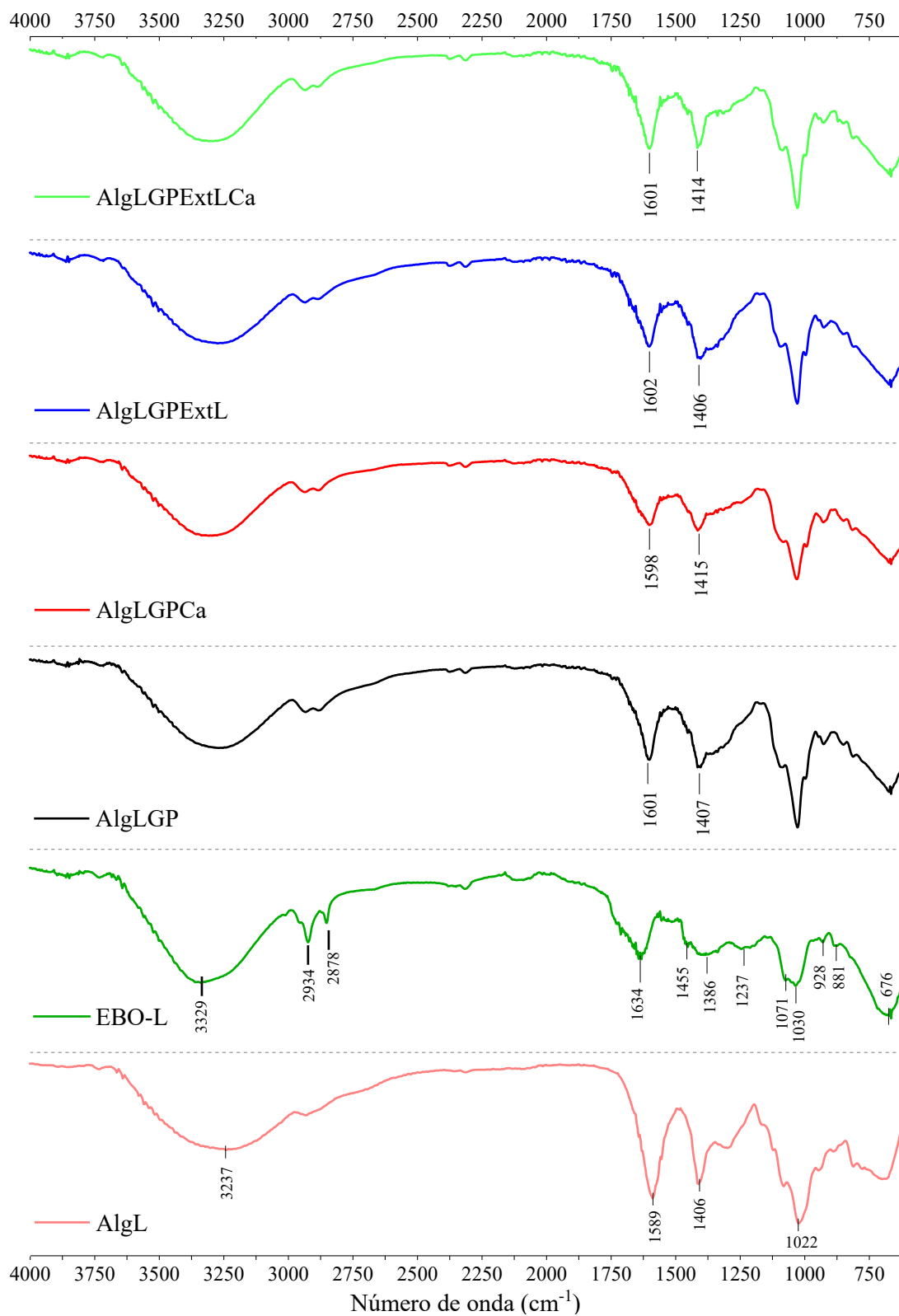


Figura 33

*Espectros FT-IR de la película a base del alginato extraído, películas cargadas con extracto, películas reticuladas, alginato extraído de *L. trabeculata* y extracto de *L. trabeculata*.*



2. Termogravimetría / Termogravimetría derivativa (TGA/DTG)

2.1. Condiciones de Trabajo

El análisis termogravimétrico se realizó en un equipo de TA Instruments modelo SDT Q600 en el laboratorio del Instituto de Química de São Carlos (IQSC) de la Universidad de São Paulo en Brasil (USP). Las mediciones se trabajaron en atmosfera inerte (N₂) a un flujo de 50 mL min⁻¹, en un rango de temperatura de 30 a 1000 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C min⁻¹ y en unos crisoles térmico de alúmina (óxido de aluminio). Los datos obtenidos del TGA/DTG fueron graficados con el programa OriginPro 2018.

2.2. Características y análisis de los termogramas

En las **Figuras 34 y 35** se presentan los termogramas (TGA/DTG) de las películas, en donde se tienen las siguientes observaciones:

Las películas presentaron los procesos de descomposición térmica del alginato, se evidenció los procesos de deshidratación, descomposición/degradación y transformación del residuo a materiales carbonosos.

Para las películas bases, sin adición de extracto ni reticulación, en la primera etapa, analizado entre los 30 °C a 160 °C, se obtuvo la primera pérdida de masa entre los 6 -11 % asociado a la evaporación del agua, de los plastificantes y/o trazas de solventes (S. Kim et al., 2018; Shaari et al., 2018); en la segunda etapa, entre los 160 °C a 300 °C, se obtuvo el mayor porcentaje de pérdida de masa (56 – 60 %) debido a la descomposición de la matriz polimérica y de los plastificantes (Aloui et al., 2021), en simultáneo se produce la despolimerización y pirólisis de las cadenas poliméricas (Nguyen et al., 2020) que puede ocurrir hasta los 500 °C en donde se genera la degradación de los fragmentos obtenidos previamente, con pérdidas de masa entre los 8 -11 %; en la última etapa se tiene la conversión de los componentes degradados a materiales carbonosos (Soares et al., 2004).

Al comparar las películas con los alginatos que se emplearon como base, se observa una disminución en la temperatura de degradación, en el caso de los alginatos de partida caracterizados anteriormente, la temperatura era alrededor de los 250 °C mientras que en las películas fue a los 217 °C, esto debido a la presencia del plastificante (Gao et al., 2017).

En las películas que se cargaron con los extractos de macroalgas pardas se observaron ligeros cambios en la temperatura de degradación. En este caso se observó un leve incremento en la mayoría de las películas, siendo la única diferencia para la película elaborada con el alginato extraído de la *M. pyrifera* cargado con su respectivo extracto, en donde se observó una pequeña disminución en la temperatura. Estos cambios pueden deberse a la presencia de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos, los cuales inducen ligeras perturbaciones en la matriz polimérica, influenciando la temperatura de deshidratación y descomposición del material. También los compuestos polifenólicos son más sensibles al calor por lo que promueve la variación de la temperatura de degradación. Acorde a Aloui et al., 2021 la temperatura se incrementa acorde a la concentración de los extractos, mientras que Nguyen et al., 2020 manifiesta una disminución en la temperatura con relación a los extractos fenólicos. En general, la incorporación de los extractos en las películas de alginato no influye drásticamente en la estabilidad térmica de las películas.

Con respecto a las películas reticuladas se observó que en la primera etapa los porcentajes de pérdida de masa disminuyeron a comparación de las películas bases y de las películas cargadas con extractos. Esta disminución se debe a que en el caso de los polisacáridos, estos tienen una fuerte afinidad al agua debido a que poseen grupos hidrofílicos en sus cadenas, en el alginato de sodio se tiene dos hidroxilos (-OH) y un grupo carboxilato (-COO⁻) para cada residuo gulurónico y manurónico los cuales pueden interactuar con el hidrógeno del agua; sin embargo, la reticulación con una solución de calcio en las películas produce un intercambio iónico donde los iones de calcio reemplazan a los iones de sodio generando una disminución de los sitios hidrofílicos (Bekin et al., 2014; Giz et al., 2020); por ende, absorbe menos humedad lo que se evidencia en el TGA. En la segunda etapa se evidenció en las curvas DTG (**Figura 35**) un aumento en la temperatura de degradación del material debido a que se tiene un ordenamiento de las cadenas poliméricas lo que conduce a la formación de una red rígida y semi-penetrante (Xiao et al., 2002). Otro detalle se observa en la disminución de la pérdida de masa también en esta etapa debido a la presencia del calcio en los carboxilatos de las cadenas del alginato se tiene un proceso de descomposición y degradación más lento lo que se confirma con el aumento de temperatura observado en las curvas DTG de la **Figura 35** y cuyos datos se reportan en la **Tabla 32**. En la siguiente etapa, la formación de residuos carbonosos evidencia un aumento en el porcentaje de la pérdida de masa debido a que se tendrá carbonato de sodio (Na₂CO₃) y

carbonato de calcio (CaCO_3) por ello la cantidad aumenta. Esto también se observa al final del análisis, los residuos en las películas reticuladas tienen un mayor contenido.

En la **Tabla 32** se indican los porcentajes de pérdida de peso de las películas realizadas con el alginato referencial, el alginato extraído de la *M. pyrifera* y el alginato extraído de la *L. trabeculata*, así como el cargado con extracto los extractos hidroalcohólicos de cada especie de macroalga parda y sus respectivas reticulaciones.

Tabla 32

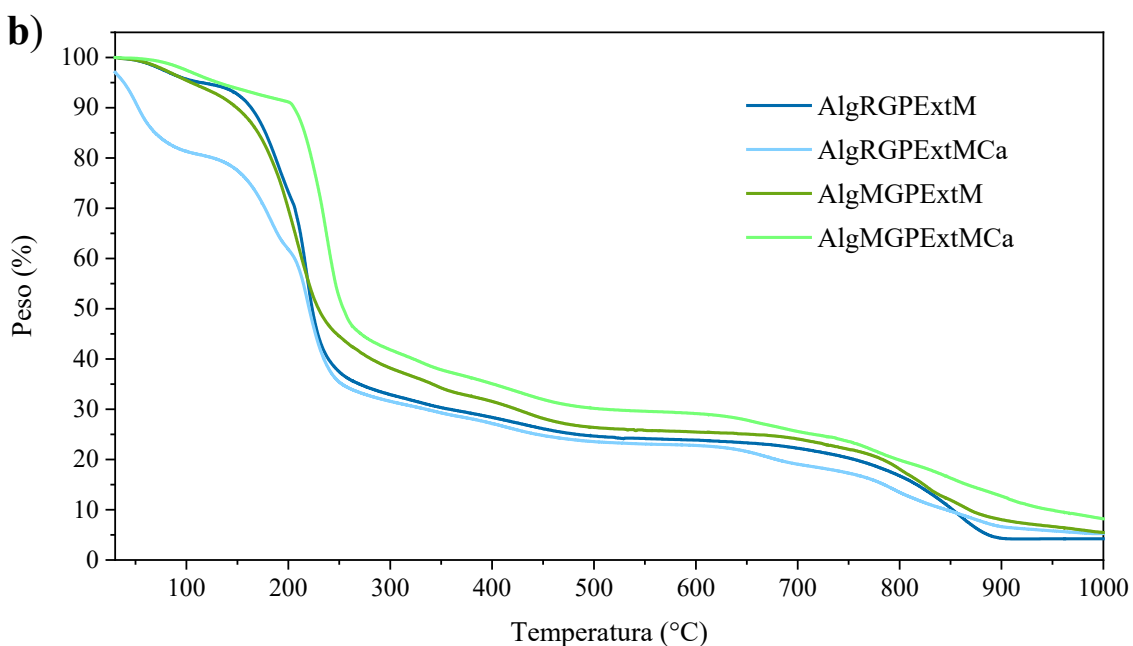
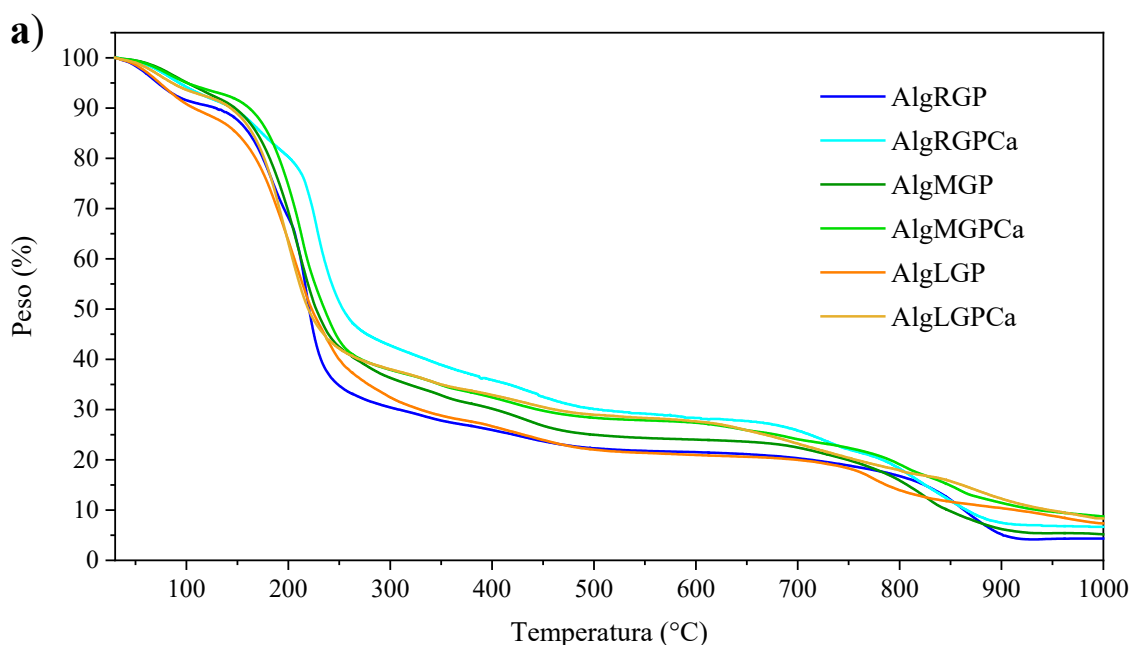
Resultados de la termogravimetría (TGA/DTG) en atmósfera inerte de las películas.

N°	Composición	Porcentaje de Pérdida de Peso (%)					DTG (°C)
		Deshidratación	Descomposición	Degradación	Formación de Carbonato	Residuo	
#1	AlgRGP	9.32	60.51	8.25	17.69	4.22	217
#2	AlgRGPCa	7.25	49.81	13.62	22.41	6.91	228
#3	AlgRGPExtM	4.94	62.14	8.59	20.07	4.26	218
#4	AlgRGPExtMCA	19.26	48.93	8.69	17.79	5.31	226
#5	AlgRGPExtL	5.28	63.19	8.14	18.23	5.14	219
#6	AlgRGPExtLCA	6.84	46.55	15.08	24.65	6.88	227
#7	AlgMGP	6.77	56.67	11.98	19.32	5.25	211
#8	AlgMGPCa	5.75	56.21	10.05	19.62	8.96	212
#9	AlgMGPExtM	5.68	56.10	12.43	19.66	6.13	210
#10	AlgMGPExtMCA	3.94	54.19	12.41	21.04	8.40	237
#11	AlgLGP	10.92	56.57	11.31	13.78	7.42	193
#12	AlgLGPCa	7.56	54.25	9.71	20.14	8.34	197
#13	AlgLGPExtL	8.68	55.49	10.39	17.33	8.09	194
#14	AlgLGPExtLCA	6.28	53.75	7.99	20.97	10.98	214

Nota. AlgR: Alginato de sodio referencial; AlgM: Alginato extraído de *M. pyrifera*; AlgL: Alginato extraído de *L. trabeculata*; G: glicerol; P: PEG400; ExtM: Extracto de *M. pyrifera*; ExtL: Extracto de *L. trabeculata*; Ca: reticulación con Calcio.

Figura 34

Termogramas (TGA) de las películas a base del: a) alginato referencial (AlgR), alginato extraído de las macroalgas pardas (AlgM y AlgL), s/c reticulación de calcio (Ca); b) alginato referencial, alginato extraído c/u cargados con el extracto de *M. pyrifera* (ExtM), s/c reticulación de calcio; c) alginato referencial, alginato extraído c/u cargado con el extracto de *L. trabeculata* (ExtL), s/c reticulación de calcio.



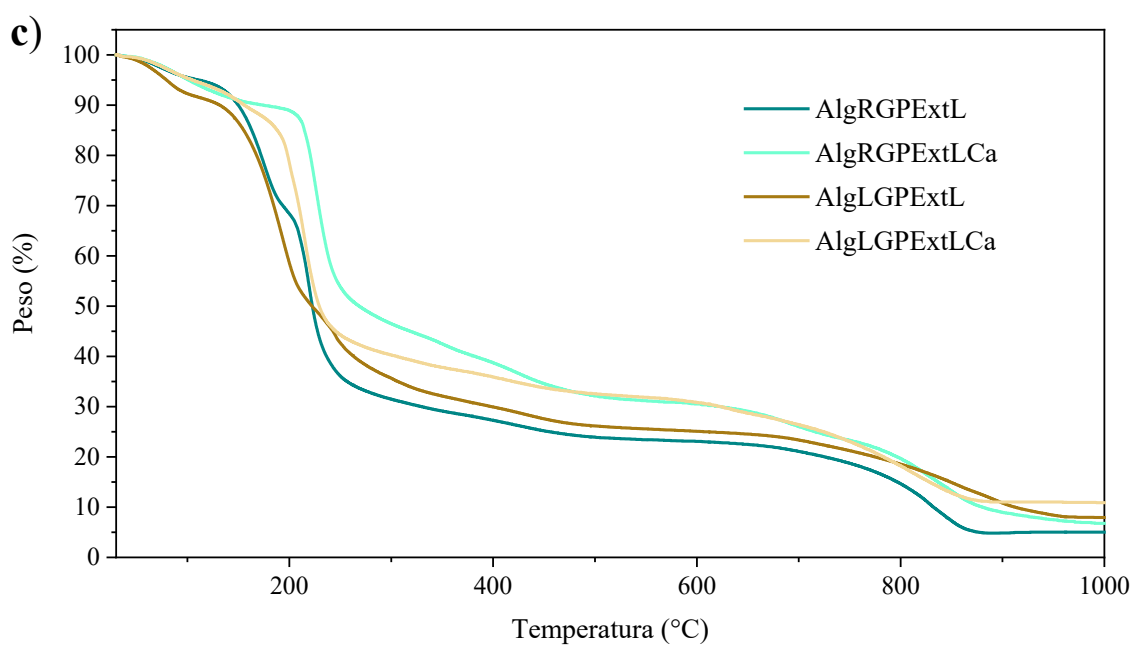
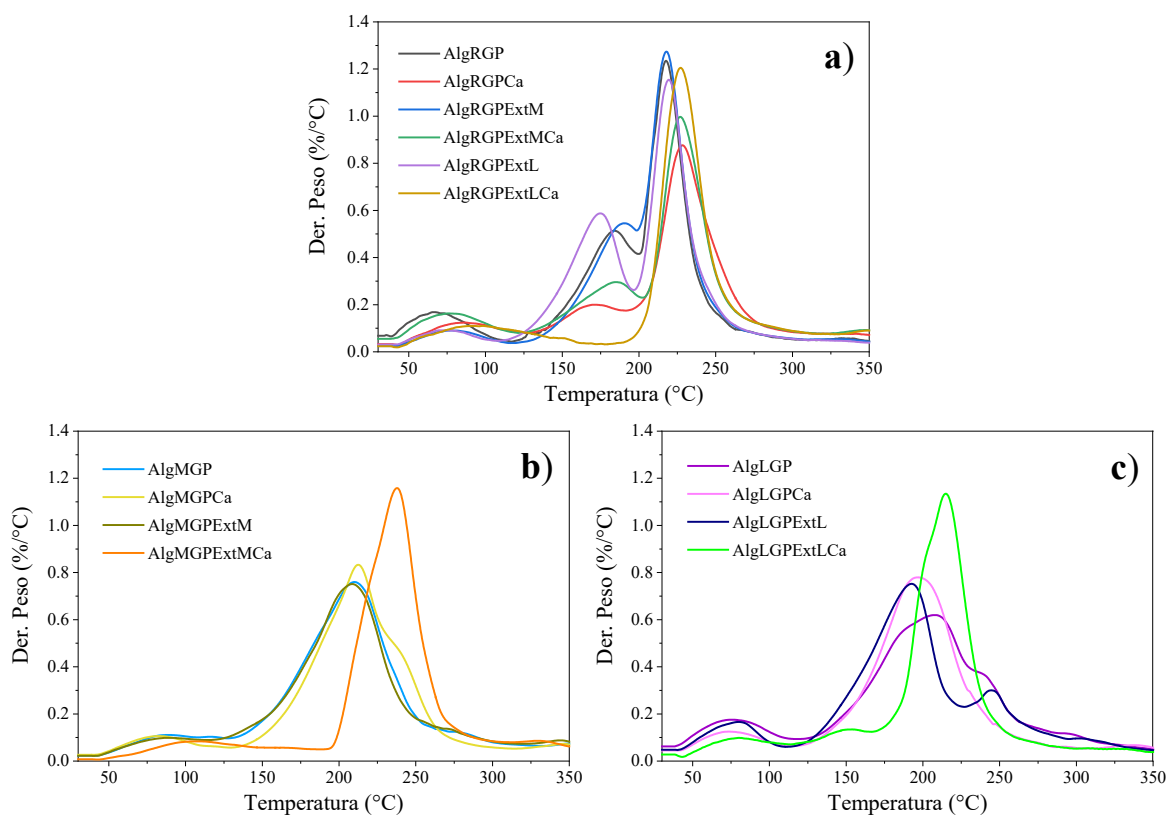


Figura 35

Curvas DTG de las películas a base del: a) alginato referencial y cargado con los extractos; b) alginato extraído y cargado con el ExtM; c) alginato extraído y cargado con el ExtL. En cada caso con sus reticulaciones de calcio correspondientes



3. Difracción de Rayos X (DRX)

3.1. Condiciones de Trabajo

Los difractogramas DRX de las muestras se trabajaron en un equipo Bruker D8 Advance con una fuente de radiación de $\text{CuK } \alpha$ ($\lambda = 0,1542 \text{ nm}$) operando a un voltaje de 40 Kv, una corriente de 40 mA y una fuente de radiación de Cu k_α ($\lambda = 0.1542 \text{ nm}$) en el rango $2\theta^\circ$ de 5 a 80° con incremento de 0.02° y tiempo de acumulación de 0.5 s por paso. El análisis se realizó en el laboratorio del Instituto de Química de São Carlos (IQSC) de la Universidad de São Paulo en Brasil (USP). Los datos fueron graficados con el programa OriginPro 2018.

3.2. Características y análisis de los difractogramas

Los DRX de los alginatos bases se indicaron anteriormente en donde se obtuvieron aproximadamente picos de difracción 2θ de 13.8° y 22.3° correspondientes al residuo gulurónico y manurónico respectivamente (Fontes et al., 2013); cuyas intensidades fueron diferentes debido a que dependían de la conformación y disposición de las cadenas del alginato, esta variación se confirmó con los resultados del RMN en donde se obtuvieron diferencias en el contenido del residuo gulurónico entre los alginatos de interés.

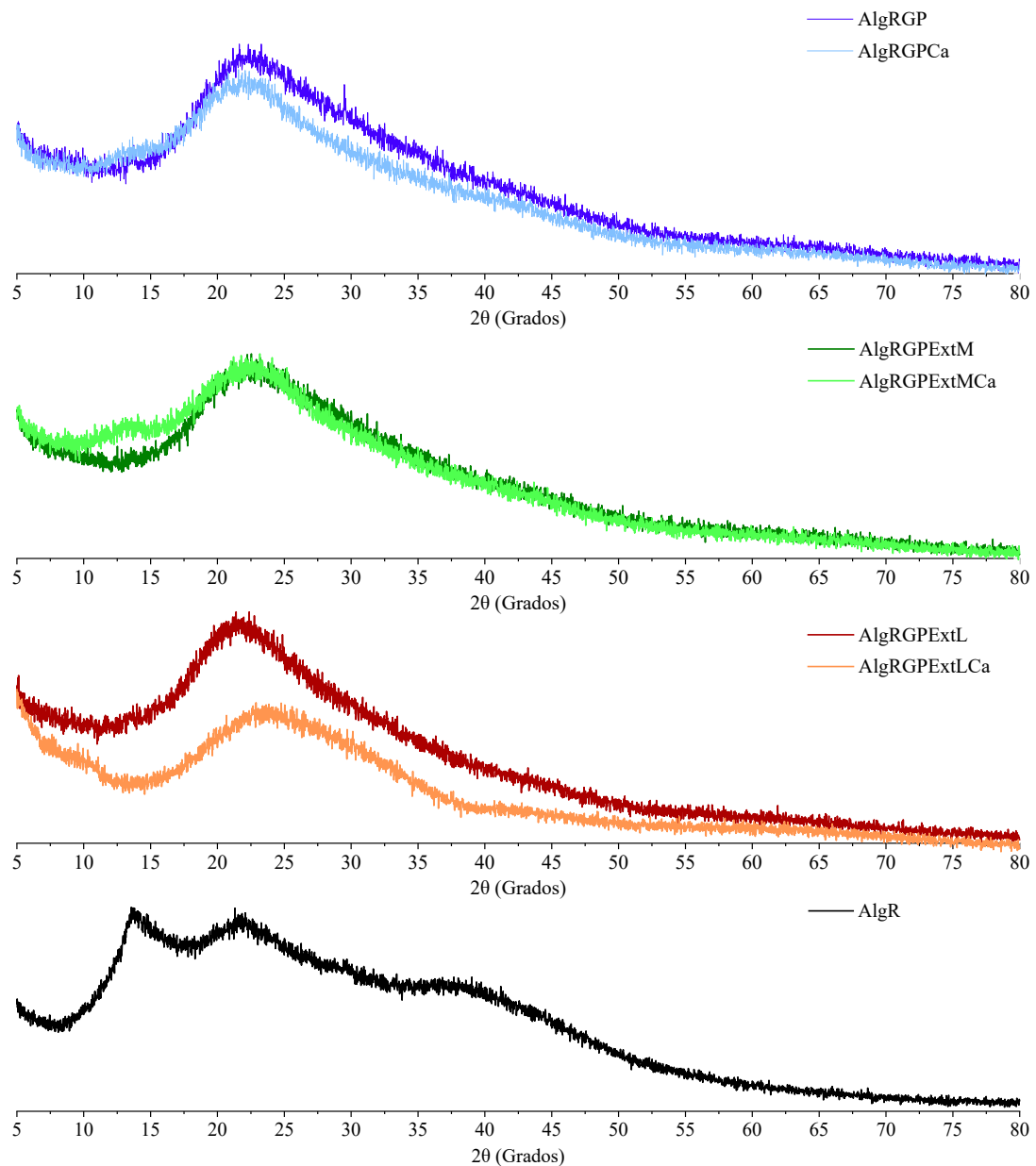
Las **Figuras 36** y **37** presentan los difractogramas de las películas en donde se observó que el pico a $2\theta = 13.8^\circ$ disminuyó a comparación del alginato base, esto es debido a la presencia del plastificante el cual cambia la estructura semicristalina del alginato a una estructura más amorfa; es decir, las interacciones intermoleculares del alginato se ven influenciadas por el glicerol, el cual forma puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos del alginato lo que facilita la movilidad de las cadenas poliméricas (Shaari et al., 2018). Esta disminución del pico también indica que se tienen mayores distancias entre las cadenas poliméricas (Gao et al., 2017). En el caso del pico de difracción a los 22.3° se incrementó y se ensanchó levemente lo que indica una película más homogénea.

En el caso de las películas cargadas con los extractos, no se presentan diferencias con las películas bases, esto puede inferir que los compuestos polifenólicos de los extractos también interaccionan fuertemente con los grupos funcionales del alginato lo que elimina la semicristalinidad del alginato (Peng et al., 2020).

Los difractogramas de las películas reticuladas evidencian un pico muy pequeño casi imperceptible pero ligeramente mayor que las películas bases alrededor de los 13.8° mientras que el pico a los 22.3° se mantuvo. Asimismo, se observa un leve ensanchamiento en los picos de difracción lo que sugiere que existe un ordenamiento de las cadenas poliméricas y un espaciado entre las cadenas en forma de capas (Urquiza et al., 2011).

Figura 36

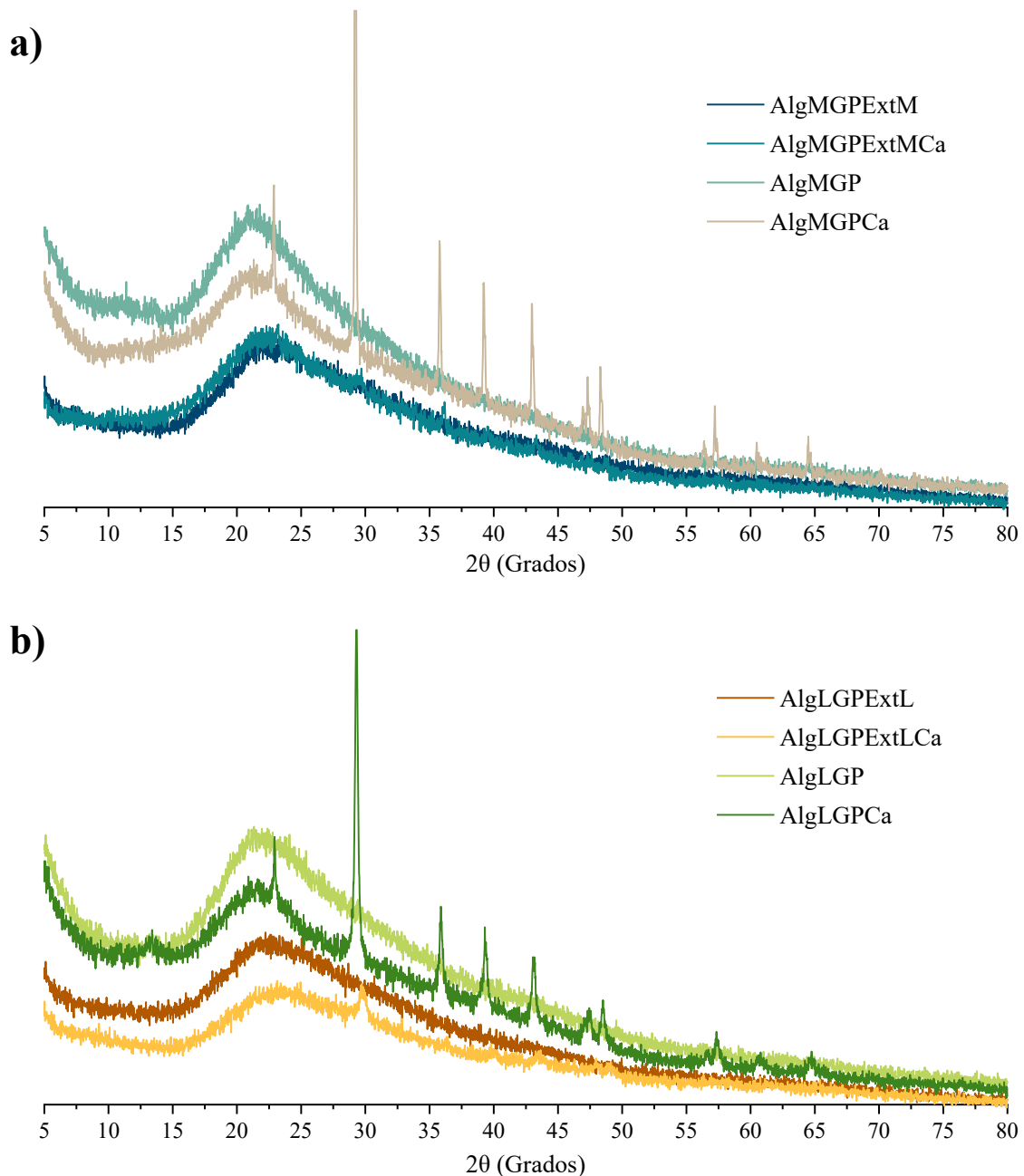
*Difractogramas (DRX) de las películas de alginato referencial, de las películas cargadas con extracto de *M. pyrifera*, cargado con *L. trabeculata* y sus reticulaciones con calcio.*



En el caso de las películas elaboradas con los alginatos extraídos, los DRX (**Figura 38**) presentan un pico intenso a 29.3° y picos menores a 35.8° , 39.4° , 43.2° , 47.8° y 48.5° que son característicos del CaCO_3 , lo que puede indicar que parte del calcio reaccionó con el carbonato remanente en la matriz polimérica del alginato (Jiang et al., 2019).

Figura 37

*Difractogramas (DRX) de las películas a base del: a) alginato extraído y cargado con el extracto de *M. pyrifera*, s/c reticulación de calcio; b) alginato extraído y cargado con el extracto de *L. trabeculata*, s/c reticulación de calcio.*



4. Transmitancia de luz y opacidad

4.1. Condiciones de Trabajo

La transmitancia de las películas se registró en un espectrofotómetro UV/Vis marca Varian Cary 50 Bio, en el rango de 200 a 700 nm. Las muestras fueron cortadas en piezas de 2 x 2 cm y colocadas en el adaptador de películas. El análisis se realizó en el laboratorio del Instituto de Física de São Carlos (IFSC) de la Universidad de São Paulo en Brasil (USP).

La opacidad se determinó a partir de la transmitancia y el espesor de cada película, acorde a Cui et al., 2021 estos valores se reemplazaron en la siguiente ecuación:

$$\text{Opacidad} = \frac{-\text{Log}(T)}{d}$$

Donde T es la transmitancia de la película a 600 nm y d es el espesor de la película en milímetros (mm).

El espesor de cada película se midió en un micrómetro digital Mitutoyo 293-MDH, rango de 0 a 25 mm, resolución de 0.0001 mm. Las muestras fueron puestas en una superficie compacta de espesor conocido y se registraron las mediciones como la diferencia con la superficie compacta. Los datos recopilados fueron tratados con el programa OriginPro 2018.

4.2. Características y análisis de las películas

La **Tabla 33** reporta los espesores, transmitancias y opacidades de las películas, en los cuales infieren que la incorporación de los extractos incrementa ligeramente el espesor de las películas posiblemente a que se produce una alineación u ordenamiento conformacional de las cadenas del alginato frente al extracto por lo que hay más sólidos dispersos en la matriz polimérica (Aydin & Zorlu, 2022). En el caso de las películas reticuladas se observó también un incremento del espesor debido al entrecruzamiento que se produce entre los cationes de calcio y los grupos carboxilatos de las cadenas poliméricas, principalmente en el bloque G, formando redes más compactas y rígidas. Acorde a distintos estudios, el empleo de soluciones reticulantes genera la disolución del alginato en la solución y el entrecruzamiento de los cationes divalentes formando películas más gruesas que las películas bases (Cofelice et al., 2019; J. Li et al., 2016).

Tabla 33

Valores del Espesor, Transmitancia y Opacidad de las películas en la región del UV-Vis.

N°	Películas	Espesor (mm)	Transmitancia (%)				Opacidad U.A.
			UV-C	UV-B	UV-A	Visible	
			240nm	300nm	360nm	600nm	
#1	AlgRGP	0.1087	36.23	58.42	71.74	87.45	0.54
#2	AlgRGPCa	0.1095	44.78	63.53	75.20	88.30	0.49
#3	AlgRGPExtM	0.1163	31.09	54.66	68.50	83.42	0.68
#4	AlgRGPExtMCa	0.1234	25.21	54.5	72.97	89.42	0.39
#5	AlgRGPExtL	0.1187	20.25	45.29	62.81	84.27	0.63
#6	AlgRGPExtLCa	0.1276	31.63	57.81	72.62	88.12	0.43
#7	AlgMGP	0.1343	1.92	12.00	24.42	55.99	1.88
#8	AlgMGPCa	0.2032	0.62	2.55	3.95	5.53	6.19
#9	AlgMGPExtM	0.1444	1.62	13.60	27.85	61.81	1.45
#10	AlgMGPExtMCa	0.2066	0.09	1.58	3.07	4.98	6.30
#11	AlgLGP	0.1114	9.30	29.61	51.12	82.60	0.75
#12	AlgLGPCa	0.1729	0.03	0.45	1.44	7.97	6.35
#13	AlgLGPExtL	0.1229	0.09	12.63	31.78	73.66	1.08
#14	AlgLGPExtLCa	0.1804	0.67	2.21	3.72	6.16	6.71

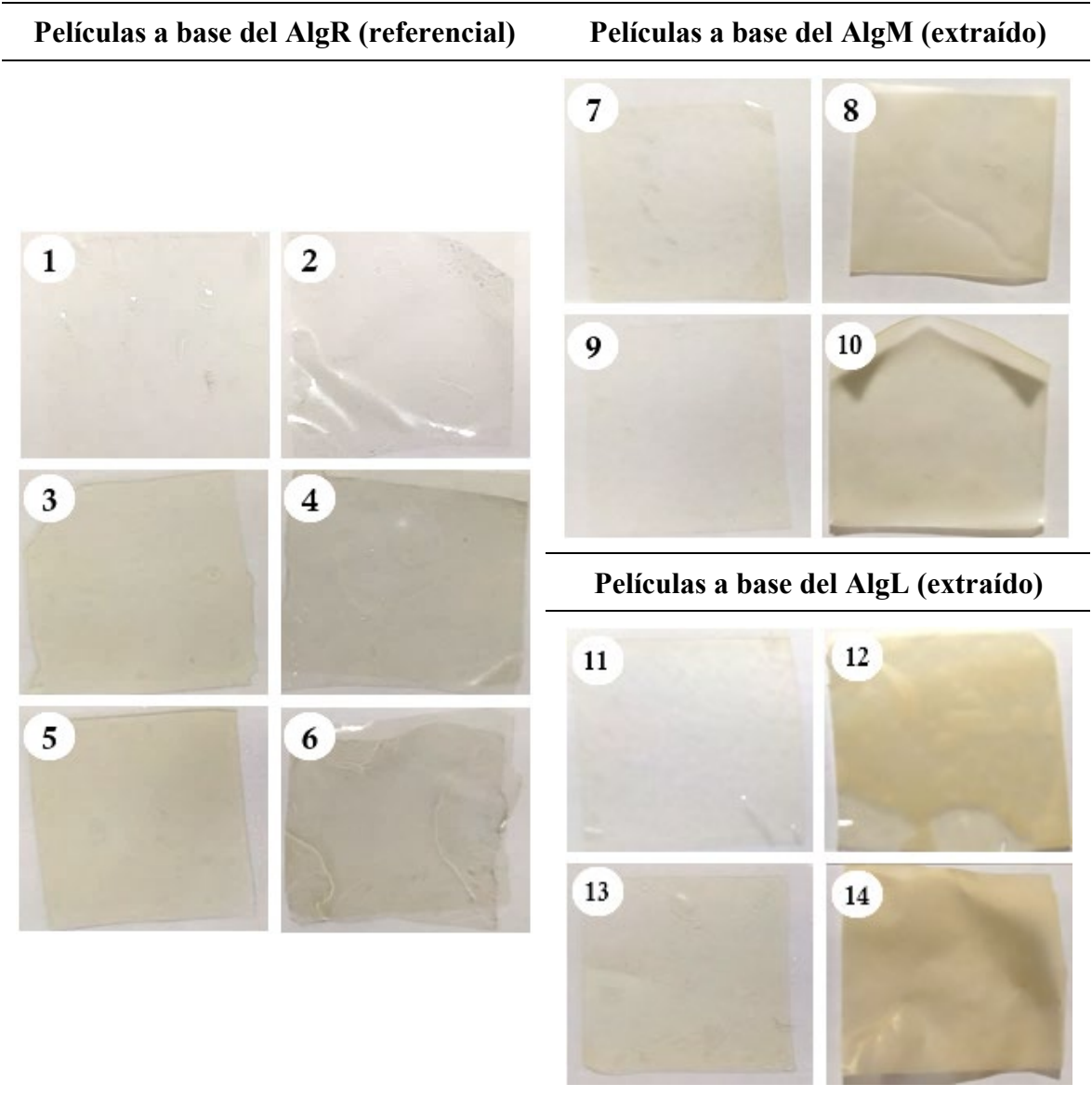
Nota. UV-C: Ultravioleta tipo C, 200 – 280 nm; UV-B: Ultravioleta tipo B, 280 – 315 nm; UV-A: Ultravioleta tipo A, 315 – 400 nm; U.A.: unidades arbitrarias.

La **Figura 38** presenta las películas elaboradas desde las películas base, películas cargadas con los extractos y películas reticuladas a modo de comparación entre sí. A primera vista las películas cargadas con los extractos y elaboradas con los alginatos extraídos de las macroalgas pardas de estudio evidenciaron cierta coloración parda-verdosa posiblemente a la presencia de compuestos polifenólicos y pigmentos como betacarotenos, fucoxantinas, violaxantinas y clorofilas entre otros que otorga el color pardo característico de este tipo de

macroalgas (Kadam et al., 2015). Asimismo, las películas a base de los alginatos extraídos y reticuladas eran semi-blanquecinas, los cuales evidenciaron opacidades mayores que las películas del alginato referencial, visualmente las diferencias fueron más notables, por lo que estas películas pueden abarcar otros campos de aplicación o funcionalidad.

Figura 38

Películas del alginato referencial, películas de los alginatos extraídos de cada macroalga, cargados con los extractos hidroalcohólicos de M. pyrifera y L. trabeculata, s/c reticulación.

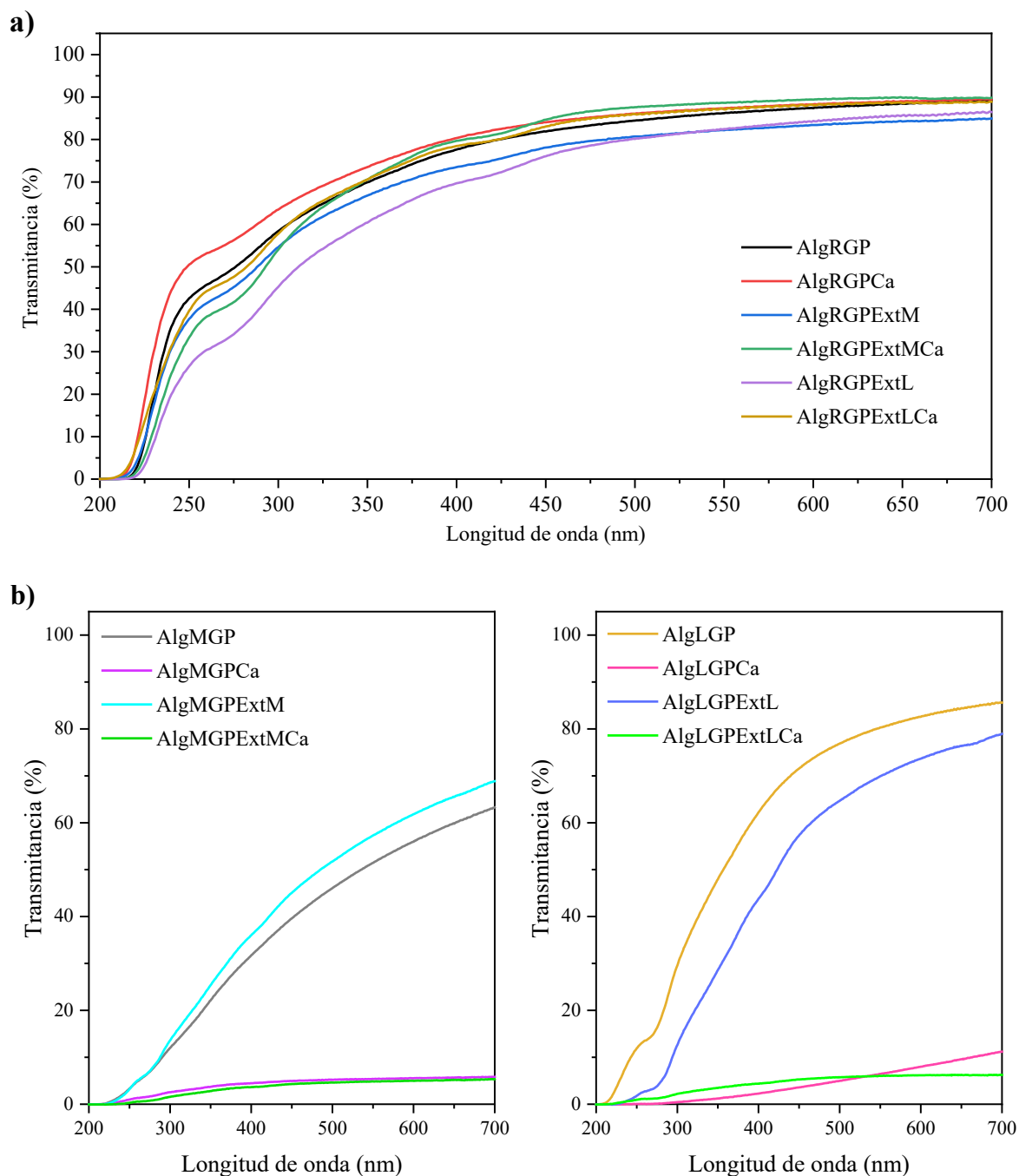


Nota. 1: AlgRGP; 2: AlgRGPCa; 3: AlgRGPExtM; 4: AlgRGPExtMCA; 5: AlgRGPExtL; 6: AlgRGPExtLCA; 7: AlgMGP; 8: AlgMGPCa; 9: AlgMGPExtM; 10: AlgMGPExtMCA; 11: AlgLGP; 12: AlgLGPCa; 13: AlgLGPExtL; 14: AlgLGPExtLCA.

A continuación, la **Figura 39** presenta los espectros de transmitancia de las películas en el rango de 200 nm a 700 nm.

Figura 39

Espectros de Transmitancia de: a) películas elaboradas con el alginato referencial, películas cargadas con los extractos y reticuladas; b) películas a base de los alginatos extraídos, películas cargadas con sus respectivos extractos y reticuladas.



Acorde a la **Figura 39.a**, en la región visible (600 nm), las películas elaboradas con el alginato referencial presentaron una transmitancia mayor del 70 % mientras que en la región ultravioleta (UV) disminuyó considerablemente, siendo el mínimo valor del 20.25 %. En comparación con las películas elaboradas con los alginatos extraídos (AlgM y AlgL) (**Figura 39.b**), las transmitancias en el visible fueron de 55.9 % (#7), 5.53 % (#8), 61.8 % (#9), 4.98 % (#10), 82.6 % (#11), 7.97 % (#12), 73.6 % (#13) y 6.16 % (#14), valores menores que sus contrapartes comparativas (mayor del 70 %) y siendo mucho menor en la región UV; en respuesta, las opacidades fueron mayores para estas películas.

Al incorporar los extractos de las macroalgas pardas se observó una disminución de la transmitancia, por ende, son más opacas, esto puede atribuirse a que la absorción de parte de la luz se da por los grupos cromóforos de los compuestos polifenólicos presentes en los extractos (Alizadeh-Sani et al., 2021; Fernández-Marín et al., 2022). En general, diversos estudios indican que las películas cargadas con extractos polifenólicos pueden brindar protección a alimentos empaquetados y prevenir la foto-degradación, asimismo, películas más opacas protegen contra la luz ultravioleta (Aloui et al., 2021; S. Y. Cheng et al., 2015; Kadam et al., 2015; S. Kim et al., 2018).

Con respecto a las películas reticuladas con calcio se observa una gran diferencia en las películas a base de los alginatos extraídos (AlgM y AlgL), siendo estos más opacos que las otras películas e inclusive se tiene un bloqueo de la luz Ultravioleta (UV) percibida en la región UV-C (240 nm). Al comparar con las películas reticuladas elaboradas con el alginato referencial no se observó mucha variación en la opacidad. Estos cambios pueden deberse a la conformación del alginato, teniendo en consideración que la reticulación o el entrecruzamiento de los cationes de calcio se posicionan e interactúan mejor con los grupos carboxilatos de los residuos gulurónicos (Bloque G) de la cadena polimérica entonces se infiere que a mayor contenido de residuos gulurónicos se tendrá mayor cantidad de iones de calcio que interactúen, esto se evidenció en los termogramas de las películas en donde los residuos fueron mayores para las películas reticuladas y elaboradas con los alginatos extraídos a comparación de las películas de alginato referencial; adicionalmente, la caracterización por RMN¹H y RMN¹³C de los alginatos extraídos indicaron mayor proporción del residuo gulurónico que el alginato referencial confirmando los resultados obtenidos en las películas.

5. Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

5.1. Condiciones de Trabajo

El análisis se realizó en un Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo marca Schottky JSM-7200F en el laboratorio del Instituto de Química de São Carlos (IQSC) de la Universidad de São Paulo en Brasil. Se trabajó con un voltaje de aterrizaje de 2.00 kv, un detector LED y a resoluciones de 10 μm y 1 μm con ampliaciones de x1000 y x5000.

Las muestras fueron previamente secadas en una estufa a 50°C durante 24 h. Luego, las películas fueron cortadas aproximadamente a 0.5 x 0.5 cm y colocadas en los soportes de oro (metalización en Au) siendo puestas a un alto vacío en un desecador por 20 minutos. Todas las muestras se mantuvieron en el desecador hasta su posterior análisis.

5.2. Características y análisis de las imágenes FESEM

En las **Figuras 40, 41 y 42** se muestran las imágenes FESEM de las películas, los cuales presentaron diferentes características superficiales.

La película a base de alginato referencial (AlgRGP) fue más compacta y homogénea que las películas elaboradas con los alginatos extraídos (AlgMGP y AlgLGP), las cuales presentaron cavidades y eran más rugosas, esto se debe por las diferentes características que presentaron los alginatos de partida. Al tener diferentes conformaciones (relación M/G) en sus cadenas poliméricas, las interacciones entre el agua, los plastificantes y el alginato varían, por lo que luego del secado las películas puedan presentar espacios. Estudios con relación al contenido de glicerol y PEG-400 en películas indican que la morfología es más homogénea debido a que el plastificante puede interactuar con las cadenas del alginato brindando movilidad y un leve ordenamiento, que luego de la evaporación del medio forma una superficie compacta (Gao et al., 2017; Yacob et al., 2021) tal como se evidenció en la película AlgRGP, mientras que en las películas de AlgMGP y AlgLGP se puede indicar que las interacciones entre los plastificantes y el alginato no fue completamente a lo largo de las cadenas poliméricas sino en secciones, por lo que la porosidad que presenta la superficie es producto del espacio dejado por el plastificante luego del secado (Shaari et al., 2018).

En el caso de las películas cargadas con los extractos de las macroalgas pardas se presentaron superficies heterogéneas, rugosas y con ciertas arrugas, los cuales se observaron mejor en las películas AlgRGPExtM y AlgRGPExtL debido a que las películas elaboradas con los alginatos extraídos y cargadas con sus respectivos extractos ya presentaban en sus películas bases superficies heterogéneas. Estos cambios morfológicos se deben a la presencia de los compuestos polifenólicos que alteran el ordenamiento de las cadenas; es así, que debido a las fuertes interacciones de los grupos afines entre los compuestos polifenólicos y las cadenas del alginato se forman protuberancias o arrugas en la superficie de las películas cargadas con extractos. De la misma manera, Aydin & Zorlu, 2022 reportó superficies irregulares y rugosas al adicionar extractos polifenólicos de las hojas de flor de Jamaica a películas de alginato; Kadam et al., 2015 trabajó con extractos del alga parda de *Ascophyllum nodosum* en películas de gelatina y caseinato, obteniendo superficies rugosas y pequeños cúmulos debido a que los extractos del alga tenían diversos compuestos fenólicos que interactúan en distintas zonas de la matriz polimérica.

En relación con las películas retículas se percibieron distintos cambios morfológicos. En las películas elaboradas con el alginato referencial y cargadas posteriormente, se observaron superficies medianamente lisas lo que puede indicar una disposición más ordenada de la matriz polimérica (Aydin & Zorlu, 2022). Para las películas realizadas con los alginatos extraídos y reticuladas con calcio se observaron morfologías muy heterogéneas y rugosas, esto puede atribuirse a las características diferentes del alginato indicado anteriormente. Acorde a Shaari et al., 2018, la presencia de cationes de calcio en películas plastificadas, cuyas cadenas poliméricas tienen cierta movilidad y están homogéneamente distribuidas, genera membranas suaves y regulares debido al reordenamiento de sus cadenas formando redes más compactas. Sin embargo, esto no se evidencia en las otras películas debido a que el entrecruzamiento de los cationes de calcio se produce en un sistema no uniforme; es decir, las películas bases de los alginatos extraídos ya evidenciaban superficies heterogéneas y cavidades, por lo que la reticulación con calcio se dio de forma irregular.

A continuación, se muestran las imágenes FESEM para tres amplitudes de estudio (x1000, x5000 y 15000) de las películas elaboradas con el alginato referencial, películas a base de los alginatos extraídos y sus comparativos con las películas cargadas con sus respectivos extractos y sus correspondientes reticulaciones con calcio.

Figura 40

Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato referencial y sus variaciones.

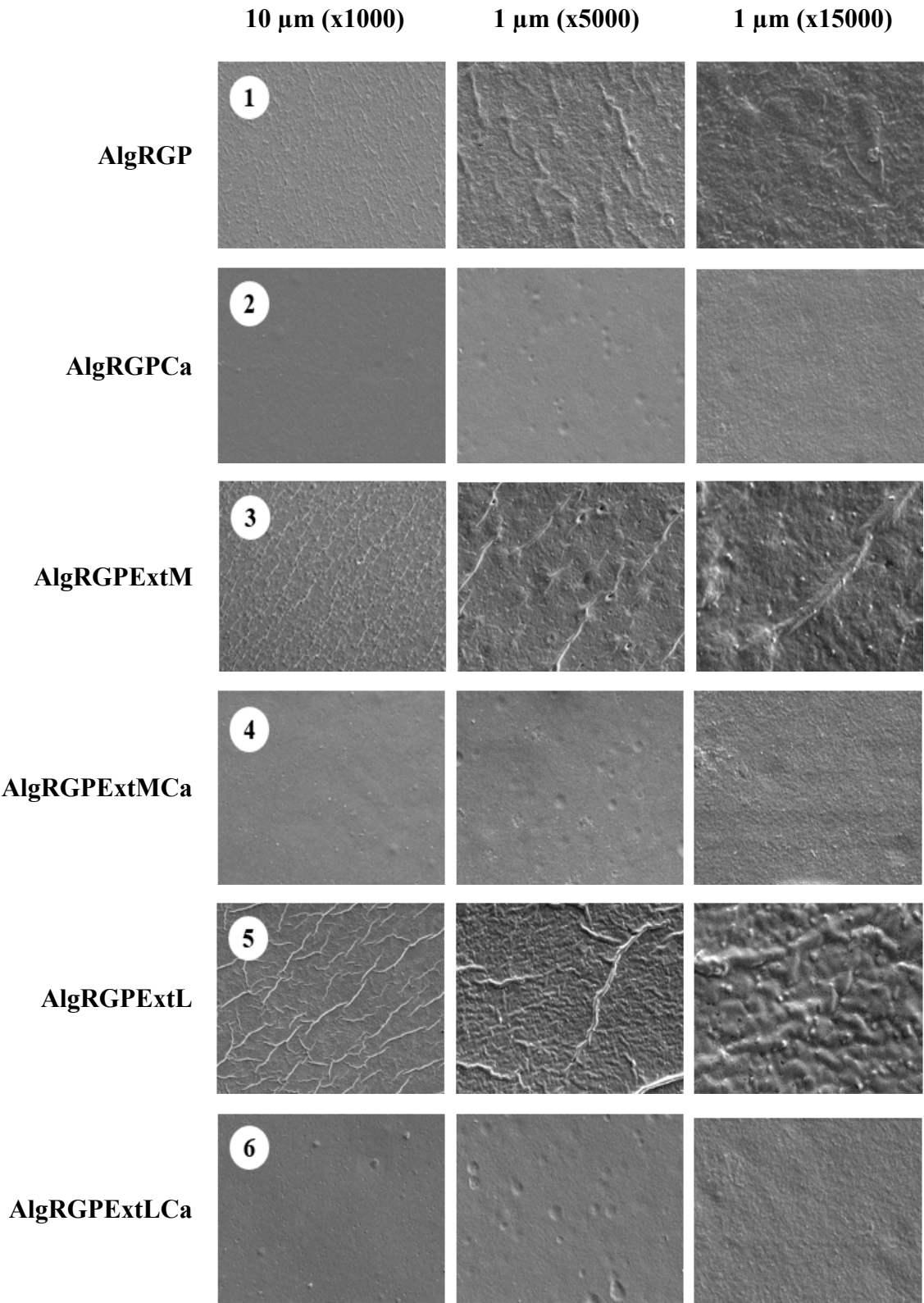


Figura 41

*Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato extraído de la *Macrocystis pyrifera*, las películas cargadas con el extracto y las películas reticuladas con calcio.*

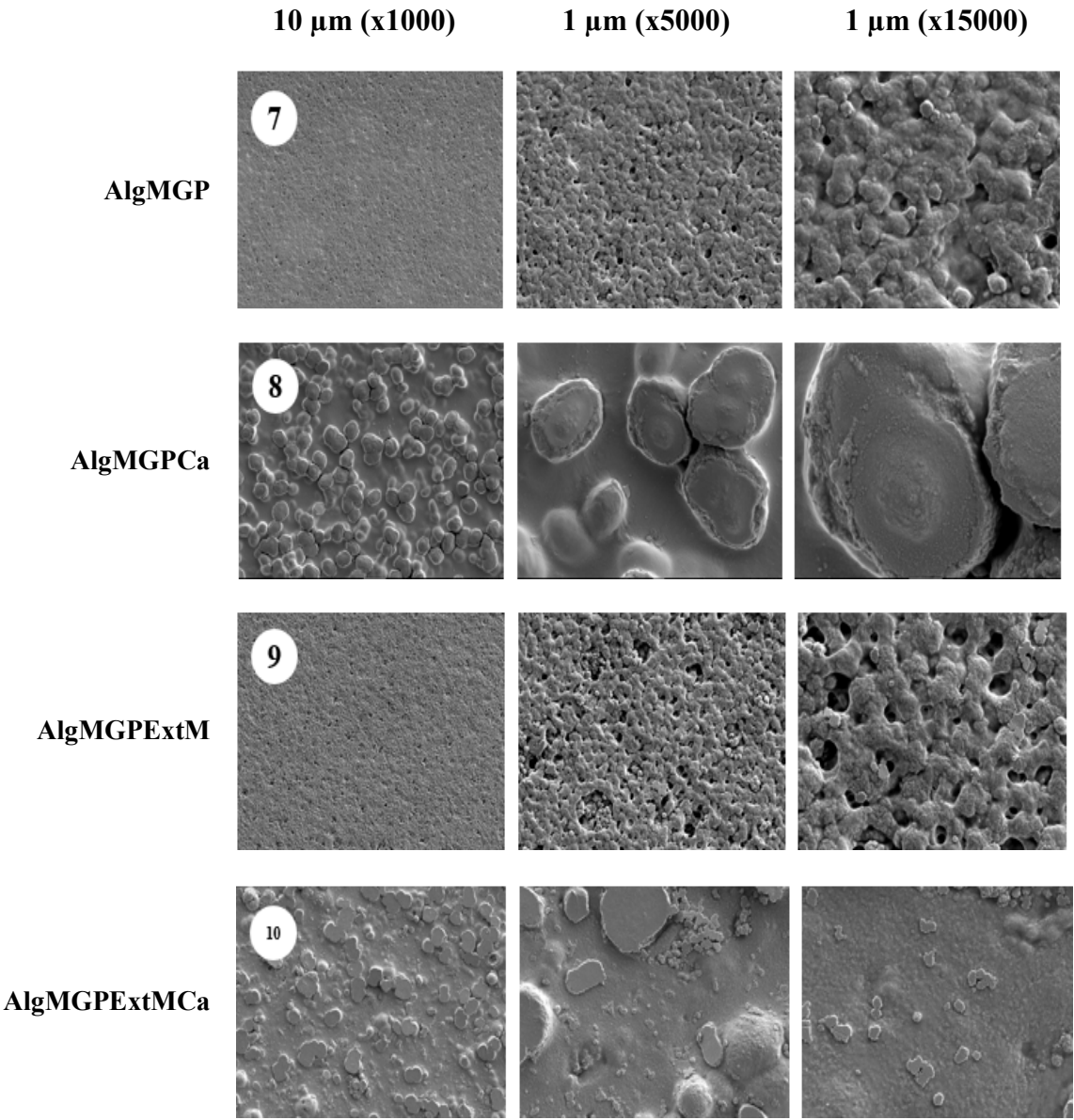
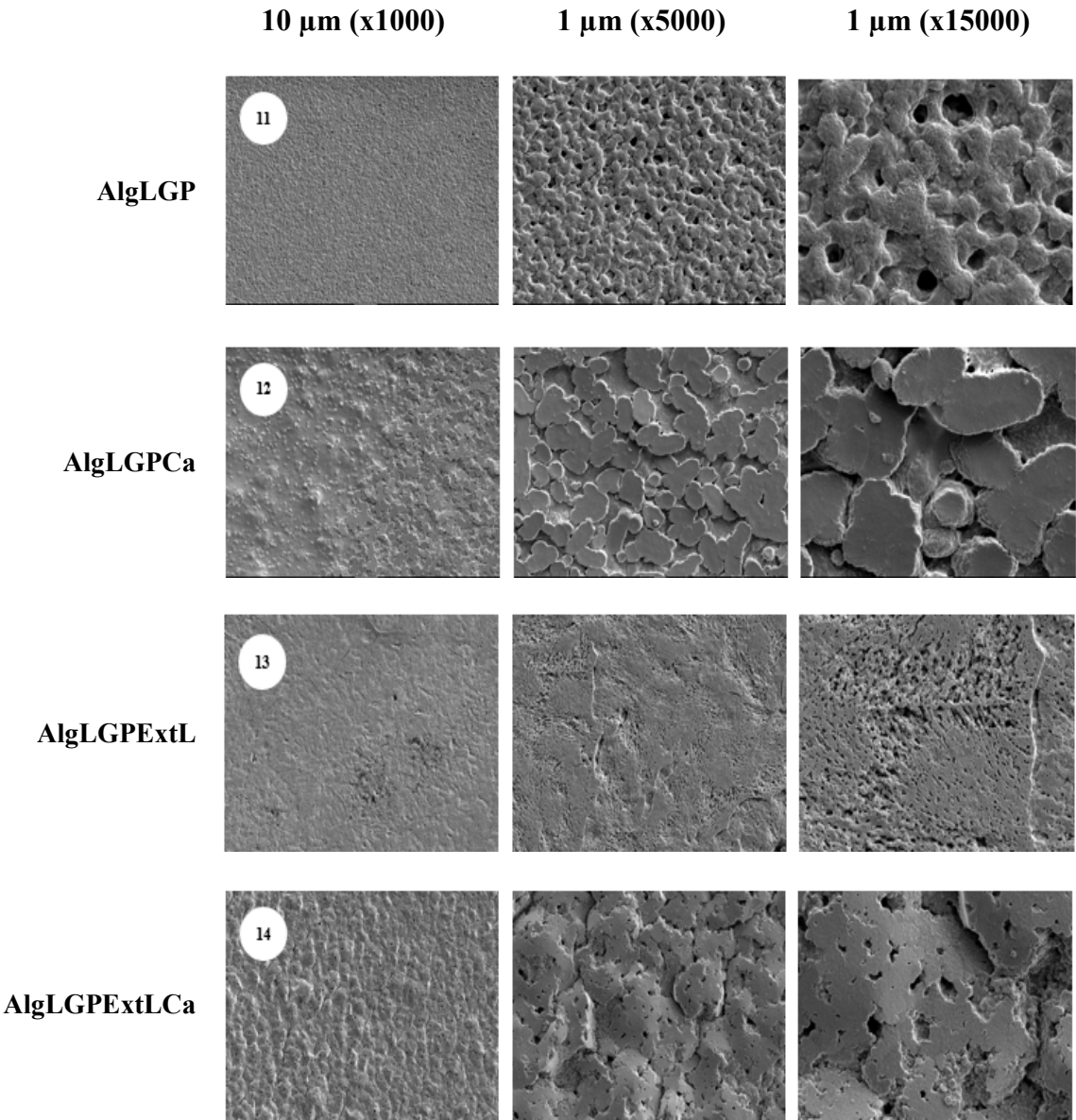


Figura 42

Imágenes FESEM de las películas elaboradas con el alginato extraído de la Lessonia trabeculata, las películas cargadas con el extracto y las películas reticuladas con calcio.



6. Características físicas de las películas

6.1. Condiciones de Trabajo

6.1.1. Espesor de las películas

Para medir el espesor de cada película se empleó un micrómetro digital Mitutoyo 293-MDH, rango de 0 a 25 mm, resolución de 0.0001 mm. Se registraron 10 medidas del espesor en secciones aleatorias de la película y se estimó el promedio de las mediciones para cada muestra.

6.1.2. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las películas se determinó por el método gravimétrico según los procedimientos de Aydin & Zorlu, 2022 y Cofelice et al., 2019, con algunas modificaciones. Para la realización del ensayo se utilizó una balanza analítica Vibra LF. Cada película se cortó en trozos de 20 x 20 mm y se pesaron las masas, registrándose como masa inicial (M_i), luego se secaron en una estufa a 105 °C durante 24 horas a fin de eliminar el agua remanente en las muestras. Posteriormente, las muestras se almacenaron en un desecador hasta que alcanzó una masa constante y se registró como masa final (M_f). El contenido de humedad se calculó acorde a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Contenido de Humedad} = \left(\frac{M_i - M_f}{M_i} \right) \times 100$$

6.1.3. Solubilidad

La solubilidad de las películas en agua se determinó acorde a los procedimientos descritos por Laohakunjit & Noomhorm, 2004 y Oliveira Filho et al., 2019, con algunas modificaciones. Se cortaron trozos de 20 x 20 mm de cada película y se secó a 105 °C durante 24 horas, luego se registró la masa (M_1). Las muestras secas se sumergieron en 10 mL de agua destilada por 30 minutos a temperatura ambiente, luego se separó el remanente sólido o insoluble y se secó a 105 °C por 24 horas, finalmente se registró la masa final (M_2). La solubilidad se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Solubilidad} = \left(\frac{M_1 - M_2}{M_1} \right) \times 100$$

6.2. Determinación y análisis de los ensayos

Tabla 34

Características físicas de las películas: espesor, humedad y solubilidad.

Nº	Composición	Espesor (mm)	Humedad (%)	Solubilidad (%)
#1	AlgRGP	0.1087 ± 0.0005	28.91 ± 0.19	61.71 ± 1.45
#2	AlgRGPCa	0.1095 ± 0.0004	27.59 ± 0.65	33.36 ± 1.18
#3	AlgRGPExtM	0.1163 ± 0.0008	29.12 ± 0.41	64.96 ± 1.24
#4	AlgRGPExtMCA	0.1234 ± 0.0006	26.34 ± 0.77	36.88 ± 1.06
#5	AlgRGPExtL	0.1187 ± 0.0005	29.24 ± 0.37	66.54 ± 1.10
#6	AlgRGPExtLCA	0.1276 ± 0.0009	25.77 ± 0.52	34.36 ± 1.39
#7	AlgMGP	0.1343 ± 0.0004	28.34 ± 0.63	65.51 ± 1.82
#8	AlgMGPCa	0.2032 ± 0.0007	26.87 ± 0.44	26.45 ± 1.44
#9	AlgMGPExtM	0.1444 ± 0.0003	28.76 ± 0.43	68.84 ± 1.13
#10	AlgMGPExtMCA	0.2066 ± 0.0005	25.91 ± 0.72	28.21 ± 1.59
#11	AlgLGP	0.1114 ± 0.0006	29.17 ± 0.90	64.48 ± 1.28
#12	AlgLGPCa	0.1729 ± 0.0006	25.64 ± 0.71	26.5 ± 1.17
#13	AlgLGPExtL	0.1229 ± 0.0008	29.35 ± 1.06	65.72 ± 1.07
#14	AlgLGPExtLCA	0.1804 ± 0.0005	25.68 ± 1.11	27.9 ± 1.38

Nota. AlgR: Alginato de sodio referencial; AlgM: Alginato extraído de *M. pyrifera*; AlgL: Alginato extraído de *L. trabeculata*; G: glicerol; P: PEG400; ExtM: Extracto de *M. pyrifera*; ExtL: Extracto de *L. trabeculata*; Ca: reticulación con Calcio.

Acorde a los resultados presentados en la **Tabla 34**, existe una marcada diferencia entre las películas base (solo alginato), las películas cargadas con los extractos y las películas reticuladas. Como se indicó anteriormente, en el caso del espesor que influye en la opacidad, los espesores de las películas bases (#1, #7 y #11) son menores a sus consecuentes películas modificadas. El espesor no solo se ve influenciado por los métodos de elaboración de las películas sino también por la adición de extractos y agentes reticulantes, los cuales aumentan en cada caso un poco más el espesor.

En la matriz polimérica de las películas, la incorporación de extractos conlleva a cambios conformacionales de las cadenas poliméricas debido a la presencia de distintos compuestos que interactúan con las cadenas; además, se tiene un aumento de componentes en las películas (mayor presencia de sólidos), por lo que se evidenció un incremento del espesor tal como se reportan en otros estudios (Aydin & Zorlu, 2022; Kadam et al., 2015; Oliveira Filho et al., 2019). Asimismo, se obtuvo otro aumento del espesor al utilizar agentes reticulantes debido a la presencia de los iones de calcio que ingresan en la matriz polimérica e interactúan con los residuos G del alginato (Cofelice et al., 2019; S. Kim et al., 2018).

Al evaluar las propiedades de las películas es necesario considerar la solubilidad y humedad del material si se espera emplearlos con fines de protección y/o almacenamiento como envases o contenedores de alimentos, siendo una de sus funcionalidades disminuir la transferencia de humedad entre el alimento y su entorno, por ende, las películas deben ser relativamente insolubles para evitar la pérdida del material pero también tener una moderada afiliación al agua que permita su aplicación en superficies de alimentos frescos, en ese sentido, los componentes de las películas influyen en sus características físicas (Mohammed et al., 2023; Tarique et al., 2021). El empleo de plastificantes aumenta la humedad y solubilidad del material debido a los grupos hidroxilos que interaccionan con el agua y la matriz polimérica, formando enlaces de hidrógeno, lo que ocasiona la retención del agua en las películas. En este caso se empleó la combinación de dos plastificantes, glicerol (cadena corta, 3OH) y PEG400 (cadena mediana, 2OH), los cuales por sus diferencias ingresan a la matriz polimérica e influyen en el sistema en diferente intensidad o manera aportando un grado higroscópico medio (Abera et al., 2020; Cao et al., 2009; Laohakunjit & Noomhorm, 2004; Suderman et al., 2018), a modo pre-experimental se elaboraron películas con diferentes proporciones de los plastificantes, siendo visualmente aceptable la proporción Glicerol:PEG400 (1:1). Otro componente en el sistema es el calcio, las películas de alginato presentan limitaciones debido al carácter hidrofílico del alginato por lo que es necesario reticular con iones divalentes (Ca^{2+}) a fin de disminuir la humedad y la solubilidad de las películas tal como se evidenció en los resultados. En el caso de los extractos, se observó un ligero aumento de la humedad y solubilidad debido a la presencia de compuestos con grupos funcionales que también influyen en la matriz polimérica al competir con los otros componentes (plastificante y alginato) en las interacciones con su entorno, estos resultados fueron igualmente reportado en otros estudios (Aydin & Zorlu, 2022; S. Kim et al., 2018).

7. Determinación de la Actividad Antioxidante de las películas

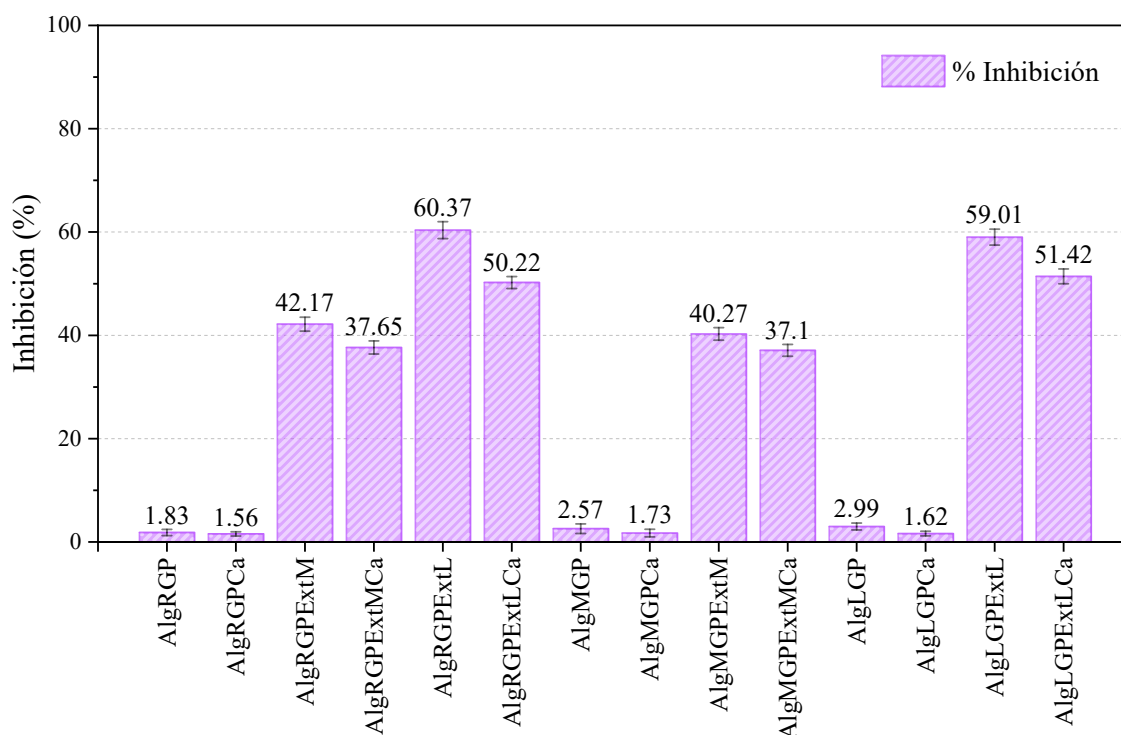
7.1. Condiciones de Trabajo

La actividad antioxidante de las películas se realizó por el método de eliminación de radicales libres de DPPH acorde a los procedimientos descritos por Aloui et al., 2021 y Kim et al., 2018, con algunas modificaciones. Se pesó aproximadamente 0.12 g de la película y se disolvió en 10 mL de agua destilada, se incubó a 45 °C durante 30 minutos, luego se retiró los remanentes sólidos. A partir de la solución obtenida, en un tubo de ensayo se colocaron 1 mL de la muestra, 1 mL de una solución metanólica de DPPH 0.1 mM y se completó el volumen a 5 mL con metanol, luego se dejó reposar en la oscuridad por 30 min y se midió la absorbancia a 517 nm. Previamente, se preparó el control y el blanco del ensayo. El blanco del ensayo es el solvente de trabajo y el control consistió en 1 mL de la solución de DPPH y 4 mL de solvente. En cada caso se guardó en oscuridad por 30 min y se registró las lecturas a 517 nm. El porcentaje de inhibición se determinó según la ecuación vista anteriormente.

7.2. Determinación y análisis del ensayo

Figura 43

Diagrama de datos comparativos de la actividad antioxidante de las películas.



Del diagrama comparativo de la **Figura 43** se infieren los siguientes resultados:

Las películas bases que no tienen incorporados los extractos de las macroalgas en cada caso, presentan un porcentaje de inhibición imperceptible en comparación con las otras películas. En el caso de las películas bases elaboradas con los alginatos extraídos de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata*, se observó una acción inferior del 3% posiblemente por la presencia de trazas fenólicas en la matriz polimérica; del mismo modo, se observó en las películas reticuladas. En adición, estos resultados pueden ser por el alginato, cuyos grupos hidroxilos presentes en las cadenas poliméricas pueden interactuar con el reactivo (Elbayomi et al., 2021); asimismo, estudios indican que alginatos de bajo peso molecular evidencian una leve acción antioxidante que puede variar según su concentración (Kelishomi et al., 2016), tal como se obtuvo en los alginatos extraídos de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata*, cuyos pesos moleculares fueron inferiores al alginato referencial.

Al analizar las películas cargadas con los extractos de *L. trabeculata* se evidenciaron porcentajes de inhibición mayor del 50 %, a comparación de las películas cargadas con los extractos de *M. pyrifera*. Estos resultados siguieron la misma tendencia del análisis de la actividad antioxidante de los extractos, en donde el extracto de *L. trabeculata* presentó una inhibición del 84.45 % y la *M. pyrifera* del 81.74 %. La acción antioxidante que evidencian las macroalgas es atribuida a los distintos metabolitos secundarios y/o compuestos fenólicos presentes en sus extractos. Las macroalgas pardas contienen exclusivamente florotaninos. Los florotaninos tienen gran importancia por su utilidad, como la acción fotoprotectora (Gaitan-Espitia & Schmid, 2020), antioxidante (Abdala-Díaz et al., 2014), antiinflamatorio (Besednova et al., 2022), entre otros.

Al evaluar las películas reticuladas en todos los casos se observa una disminución del porcentaje de inhibición, esto puede deberse a que la reticulación forma redes más firmes y/o agrupadas debido a la interacción de los residuos gulurónicos con los iones divalentes de calcio, encapsulando a los extractos en las redes poliméricas de las películas; en adición, al momento de sumergir las películas en la solución reticulante, se observa una leve coloración en la solución debido a que la película es previamente humedecida antes de empezar el proceso de reticulación, lo que podría inducir a una leve pérdida del extracto incorporado, que puede reflejarse en una leve disminución de su actividad. Acorde a los resultados se confirma la obtención de películas bioactivas (antioxidantes) en cada caso.

8. Análisis preliminar del material bioactivo

8.1. Condiciones de Trabajo

El análisis preliminar consistió en un ensayo visual evaluado en paltas Hass a fin de apreciar cambios significativos de coloración y estado del fruto. Las paltas Hass fueron colectadas de un mercado local procedente de la provincia de Chincha (Ica, Perú), en un estado de no maduración. Para su desinfección, las paltas fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.2 % (v/v) durante 2 minutos, luego lavadas con abundante agua destilada, secadas a temperatura ambiente y almacenadas a 8 °C hasta su análisis.

Para los ensayos en las paltas se realizaron dos formas de acción, películas y recubrimientos; para lo cual, se mantuvieron las proporciones de las formulaciones de las películas a fin de emplearlas en los recubrimientos; es decir, las soluciones bases para la elaboración de las películas fueron consideradas como las soluciones formadoras para los recubrimientos, asimismo, la solución reticulante fue el mismo en ambos casos.

Para el análisis en las películas, las paltas pretratadas fueron partidas a la mitad, cubiertas en su totalidad con las películas y reservadas a 8 °C con una humedad relativa entre 50 - 60 % durante 21 días con intervalos de observación de 7 días.

En el caso de los recubrimientos, las paltas pretratadas fueron inmersas en la solución formadora en su totalidad durante 2 minutos, retirado y dejado escurrir por 1 minuto y nuevamente sumergido por 2 minutos, luego de escurrir los remanentes por 5 minutos se aplicó la solución reticulante, formándose una cobertura en cada palta, del mismo modo se almacenaron a 8 °C y 50 – 60 % de humedad relativa por 21 días.

A modo comparativo para cada caso (película y recubrimiento) se trabajó con una palta desinfectada como muestra control, una muestra base sin extracto y una muestra con extracto. Además, debido a las diferencias obtenidas entre las películas a base de los alginatos extraídos, se optó por trabajar con las películas y recubrimientos de la *M. pyrifera* mientras que en la *L. trabeculata* solo se evaluó en los recubrimientos.

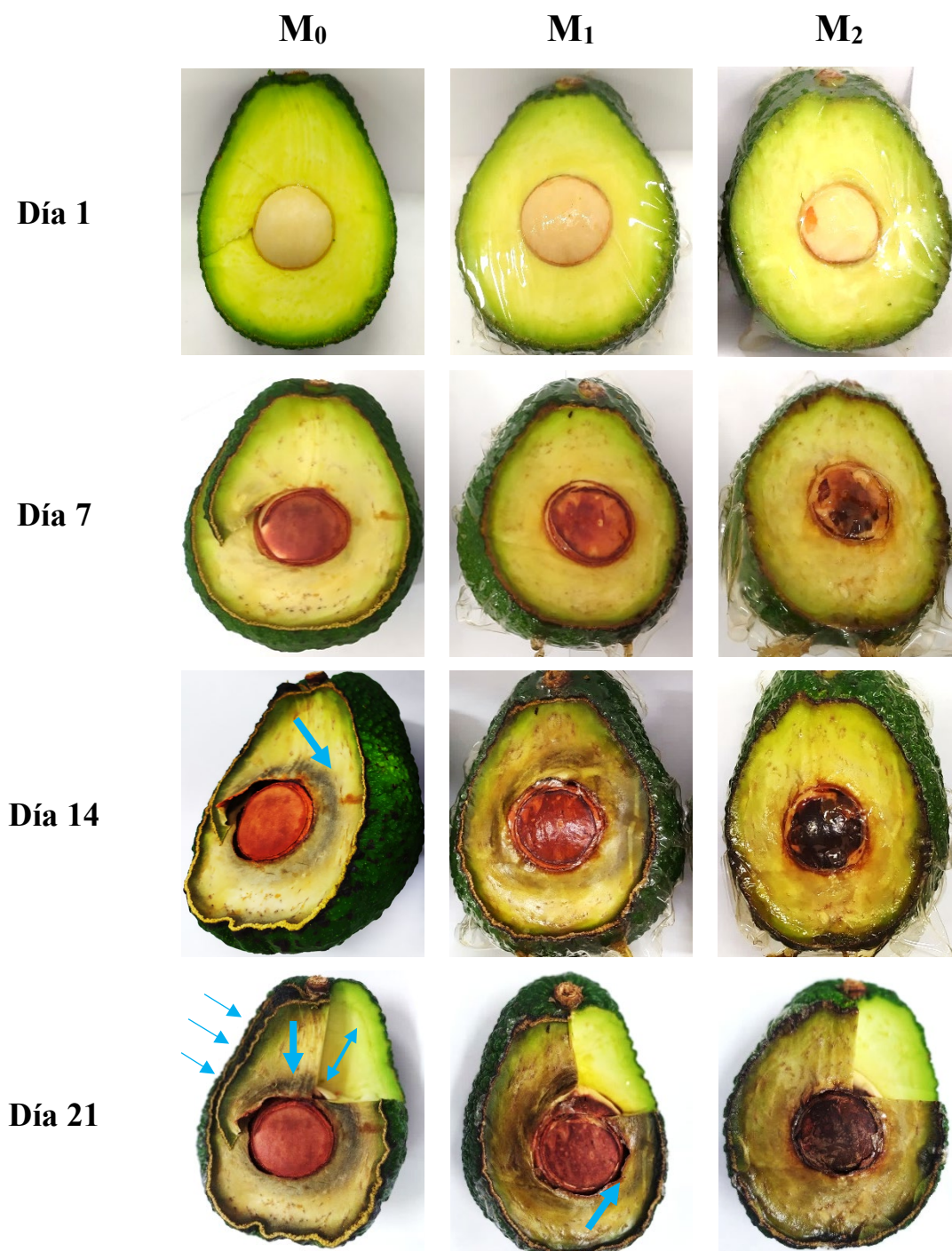
8.2. Análisis preliminar del ensayo

La **Figura 44** muestra el ensayo preliminar en la palta Hass evaluado con las películas elaboradas con la *M. pyrifera* debido a las diferencias que presentaban las películas a base de la *L. trabeculata* vistas en sus caracterizaciones, siendo la principal variable la relación M/G de los alginatos extraídos de cada especie, los cuales generaban en el caso de la *L. trabeculata* películas más sensibles al tacto; sin embargo, el extracto correspondiente a la *L. trabeculata* evidenciaba mayor actividad antioxidante que la *M. pyrifera*, por lo que se optó en otra forma de evaluar su acción frente a la palta Hass, en ese sentido el método de inmersión / aspersión, a fin de generar un recubrimiento sobre la palta Hass y considerando la misma formulación de las películas, fue realizado en todos los casos (alginato referencial y alginatos extraídos de *M. pyrifera* y *L. trabeculata*) a modo comparativo, cuyos análisis se observan en las **Figuras 45 y 46**.

En la **Figura 44**, el control (M_0) evidenció cambios de estado a los 7, 14 y 21 días que perduró el análisis. La palta control (M_0) presentó un debilitamiento del pericarpio observándose como una resequedad, un arrugamiento del exocarpio (piel) y un pardeamiento notable alrededor del endocarpio (semilla) y mesocarpio (pulpa) debido a la degradación oxidativa o procesos de maduración que incrementan la producción de etileno, afecciones por hongos, etc., que fueron reportados en otros ensayos (Iñiguez-Moreno et al., 2021; Tesfay et al., 2017); del mismo modo, el fruto cubierto con la película base (M_1) evidenció una coloración parda, mientras el fruto tratado con la película cargada del extracto (M_2) presentó una tonalidad de menor intensidad, lo que prueba el accionar del extracto al migrar de la película a la superficie del fruto brindando una barrera de protección que mantuvo la integridad del fruto hasta los 21 días del ensayo. Un análisis a los intervalos de días muestra un inicio del pardeamiento a los 7 días, siendo notorio en el endocarpio de las muestras M_0 y M_1 . Al día 14, la coloración se extendió al mesocarpio en las tres muestras, siendo más notable en las muestras M_0 y M_1 . Al día 21, el exocarpio del fruto en M_0 y M_1 tenían una leve presencia de moho posiblemente por la humedad, además la muestra M_0 presentó un exocarpio más oscuro, mientras que las muestras M_1 y M_2 tenían coloraciones parciales. Una vista al interior del fruto no reflejaba deterioro o daño a la pulpa por lo que se podría seguir evaluando por más días, esto fue en las tres muestras; sin embargo, el control (M_0) parecía más reseco y con haces vasculares un poco notorias. Estos resultados pueden diferir entre otros estudios debido a las diferencias en las condiciones del ensayo y característica del fruto.

Figura 44

*Ensayo con las películas de alginato en las paltas a los días 1, 7, 14 y 21. Palta sin cubrir (Control, M_0), palta cubierta con la película base (M_1) y palta cubierta con la película cargada con extracto de *M. pyrifera* (M_2).*



En las **Figuras 45 y 46** se evaluó el accionar de los recubrimientos en la palta Hass. Los recubrimientos de las paltas Hass se llevaron a cabo con la inmersión en una solución formadora y la aspersión de la solución reticulante, obteniéndose un fruto recubierto en su totalidad sin espacios o burbujas en la superficie. El análisis preliminar en las paltas Hass transcurridos 21 días, evidenció en el fruto con la solución formadora base (#2) un exocarpio oscuro mientras en el fruto sin recubrir se observó un ennegrecimiento del exocarpio más drástico y un ablandamiento del mesocarpio (**Figura 45.a y 45.b**). En el caso de los frutos recubiertos con las soluciones formadoras cargadas con los extractos (#4, #6, #10 y #14) se observaron exocarpios con zonas pardas de muy baja intensidad, siendo el recubrimiento con el extracto de la *L. trabeculata* sin diferencia significativa con respecto al día 1 del análisis. Además, al inspeccionar el interior de cada fruto no se evidenciaron ablandamientos ni pardeamientos del mesocarpio hasta el día 21 (**Figura 45.c y 45.d**).

En general, las películas y recubrimientos que incorporaron los extractos de las macroalgas permitieron mantener las paltas Hass hasta 21 días del análisis (**Figura 46**), lográndose reducir el pardeamiento oxidativo, el deterioro del pericarpio y el ablandamiento del fruto. En adición, estos ensayos preliminares en el fruto evidenciaron las diferencias y practicidades que se pueden obtener al desarrollar películas y recubrimientos.

Figura 45

(a) Palta Control al día 1, (b) Palta Control al día 21, (c) Palta recubierta al día 21, (d) Vista interna de la palta recubierta al día 21.



Figura 46

Ensayo del recubrimiento con alginato cargado con los extractos de macroalgas pardas en las paltas, desde el día 1 hasta el día 21.

Nº	Composición	Día 1	Día 21
#2	AlgRGPCa		
#4	AlgRGPExtMCa		
#6	AlgRGPExtLCa		
#10	AlgMGPExtMCa		
#14	AlgLGPExtLCa		

CONCLUSIONES

A partir de las macroalgas pardas se logró obtener extractos con rendimientos máximos de $12.47 \pm 1.06 \%$ y $9.88 \pm 0.92 \%$ de las hojas de las especies de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata* respectivamente, considerando como medio de extracción idóneo una mezcla hidroalcohólica de etanol al 80 %. Acorde a los extractos obtenidos en distintos medios se realizaron ensayos de CFT y DPPH de cada especie. En la determinación del CFT de los extractos mediante el método de Folin – Ciocalteu, se obtuvo mayores resultados en las hojas de cada especie 94.13 ± 1.01 y 187.70 ± 1.12 mg EqAG/100 g Ms de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata* respectivamente. En el caso de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos mediante el método de DPPH, se obtuvieron porcentajes de inhibición del 81.74 ± 1.12 y $84.45 \pm 1.04 \%$ para los extractos de las hojas de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata* respectivamente. En cuanto al CI_{50} de los extractos se obtuvo para estos casos 2.27 y 0.37 mg del extracto mL^{-1} de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata* respectivamente. En relación con los resultados obtenidos, se concluye que los extractos de cada especie de macroalga parda tienen el potencial de actuar como antioxidantes naturales, por lo que se utilizó como aditivo en la elaboración de películas bioactivas.

Con respecto a la extracción del alginato de sodio a partir de las macroalgas, se obtuvieron rendimientos totales de $17.99 \pm 0.36 \%$ de la *M. pyrifera* y $26.89 \pm 0.39 \%$ de la *L. trabeculata*. Los alginatos extraídos de cada especie fueron caracterizados mediante su análisis por FT-IR, TGA/DTG, DRX, RMN^1H y $RMN^{13}C$ en estado sólido, obteniéndose resultados que guardan similitudes a los reportados en las literaturas y al patrón del alginato referencial (Sigma-Aldrich); por lo que los productos extraídos corresponden con lo esperado al alginato de sodio. En adición, la determinación de la masa molar promedio de los alginatos extraídos realizado por viscosimetría capilar infirieron valores de 136 347 y 156 942 $g\ mol^{-1}$ de las hojas y tallos respectivamente de la *M. pyrifera* y valores de 45 166 y 77 504 $g\ mol^{-1}$ de las hojas y tallos respectivamente de la *L. trabeculata*, resultados muy diferentes al alginato referencial, por lo que las películas elaboradas con estos alginatos evidenciaron distintas características, principalmente en los procesos de reticulación.

Se elaboraron películas a base de alginato referencial cargados con los extractos de cada especie y reticulados con calcio. Asimismo, se elaboraron películas con los alginatos

extraídos cargados con sus respectivos extractos y reticulados posteriormente, de esta forma se analizó sus características antes y después del cargado de extractos y del reticulado.

Las películas obtenidas fueron caracterizadas por su análisis de FTIR, TGA, DRX, Opacidad, FESEM, propiedades físicas (solubilidad y humedad) y se determinó la actividad antioxidante de cada muestra. Por medio de los cuales se obtuvieron diferencias notables en sus morfologías y en su acción antioxidante, siendo las películas cargadas con el extracto de *L. trabeculata* de mayor potencial (Mayor del 50 %). Asimismo, el cargado de las películas con extractos de macroalgas y la reticulación de las películas con calcio influyen en la opacidad, siendo mayores en las películas elaboradas con los alginatos extraídos. Con relación a su estabilidad térmica los extractos no influyen drásticamente cambios térmicos; sin embargo, la reticulación con calcio desplaza la temperatura de degradación de las películas. Los análisis por FTIR permitió evidenciar la incorporación de los iones de calcio en las películas, observándose desplazamientos en torno a las señales del carboxilato, con respecto al cargado se evidenció también cambios en las intensidades de los espectros. En los análisis por DRX, la acción de los plastificantes generó películas amorfas.

En conclusión, las películas mostraron grandes diferencias entre sí por lo que sus utilidades pueden ser diversas. En el caso de las películas a base de los alginatos extraídos, al tener mayor opacidad pueden emplearse contra la foto-degradación en la región UV/Vis permitiendo preservar alimentos, mientras que las películas elaboradas con alginato referencial al ser translúcidas se pueden emplear en distintos empaquetamientos visuales.

Como enfoque previo, se realizó el análisis preliminar de las películas elaboradas, las cuales fueron evaluadas en paltas Hass con la finalidad de observar cambios de coloración y estado del fruto. Acorde a las características de las películas se optó por trabajar también con recubrimientos tomando como base las formulaciones de las películas. En ambos casos la incorporación de los extractos de las macroalgas permitió reducir el pardeamiento oxidativo y el deterioro del fruto hasta 21 días que se desarrolló el análisis a comparación del control (palta lavada) cuyo deterioro fue notable.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Evaluar las propiedades de barrera de los materiales elaborados mediante el ensayo de permeabilidad frente al etileno y dióxido de carbono a fin de analizar otras características de las películas.

Evaluar las propiedades mecánicas de las películas con relación al espesor y analizar las características de realizar las películas por el método de moldeo o “casting” y por el método de inmersión o “coating”.

Realizar un enfoque a profundidad a fin de evaluar la transferencia de gases, humedad y firmeza de las paltas Hass al cubrirlas con las películas diseñadas.

Realizar estudios de actividad antimicrobiana o antifúngica de los extractos de las macroalgas pardas frente a microorganismos que afectan la población de frutos climatéricos.

Evaluar la ecotoxicidad y degradación del biomaterial.

Realizar un análisis de LC-MS a los particionamientos de los extractos de las macroalgas pardas con el objetivo de identificar a los compuestos causantes del accionar de las macroalgas, así como confirmar la presencia de florotaninos (compuestos principales en las macroalgas pardas).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala-Díaz, R., Cabello-Pasini, A., Márquez-Garrido, E., & Figueroa, F. L. (2014). Intra-thallus variation of phenolic compounds, antioxidant activity, and phenolsulphatase activity in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyceae) from southern Spain. *Ciencias Marinas*, 40(1), 1-10. <https://doi.org/10.7773/cm.v40i1.2350>
- Abera, G., Woldeyes, B., Demash, H. D., & Miyake, G. M. (2020). The effect of plasticizers on thermoplastic starch films developed from the indigenous Ethiopian tuber crop Anchote (*Coccinia abyssinica*) starch. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 581-587. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.218>
- Abraham, J., Mohammed, A., Kumar, M. P., George, S. C., & Thomas, S. (2018). Thermoanalytical Techniques of Nanomaterials. En *Elsevier eBooks* (pp. 213-236). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-101973-3.00008-0>
- Afzal, S., Khan, S., Ranjha, N. M., Jalil, A., Riaz, A., Haider, M. S., Sarwar, S., Saher, F., & Naeem, F. (2018). The Structural, Crystallinity and Thermal Properties of pH responsive Interpenetrating Gelatin/Sodium Alginate Based Polymeric Composites for the Controlled Delivery of Cetirizine HCl. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.4274/tjps.64326>
- Alizadeh-Sani, M., Tavassoli, M., McClements, D. J., & Hamishehkar, H. (2021). Multifunctional halochromic packaging materials: Saffron petal anthocyanin loaded-chitosan nanofiber/methyl cellulose matrices. *Food Hydrocolloids*, 111, 106237. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106237>
- Aloui, H., Deshmukh, A. R., Khomlaem, C., & Kim, B. S. (2021). Novel composite films based on sodium alginate and gallnut extract with enhanced antioxidant, antimicrobial, barrier and mechanical properties. *Food Hydrocolloids*, 113, 106508. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106508>
- Alzarea, A. I., Alruwaili, N. K., Ahmad, M. M., Munir, M. U., Butt, A. M., Alrowaili, Z., Shahari, M. S. B., Almalki, Z. S., Alqahtani, S. S., Dolzhenko, A. V., & Ahmad, N. (2022). Development and Characterization of Gentamicin-Loaded Arabinoxylan-Sodium Alginate Films as Antibacterial Wound Dressing. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2899. <https://doi.org/10.3390/ijms23052899>
- Andriamanantoanina, H., & Rinaudo, M. (2010). Characterization of the alginates from five madagascan brown algae. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 555-560. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.002>
- Apumayta, E. V. (2019). Actividad antioxidante y determinación del contenido de fucoidano, compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de macroalga parda *Lessonia trabeculata*. En *Universidad Nacional Agraria La Molina*. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/3906>
- Arakaki, N., Gil-Kodaka, P., Carbajal, P., Gamarra, A., & Ramírez, M. E. (2018). Macroalgas de la Costa Central del Perú. En *Universidad Nacional Agraria La Molina*.
- Arias, N. B. (2017). Microesferas de biopolímeros mediante microfluída para aplicación médica. En *Universidad de Chile*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/146096>
- Aroa, M. R., & Argimiro, M. S. (2011). The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chemistry*, 125(3), 1104-1109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>
- Arredondo, T. (2012). Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco. En *Universidad Autónoma de Querétaro*.
- Asadi, D. A. (2023, 2 enero). Una isla de plástico en el Océano Pacífico. *iAgua*. <https://www.iagua.es/blogs/darya-ahmadi-asadi/isla-plastico-oceano-pacifico>
- ASTM F2259-10. (2012). Standard Test Method for Determining the Chemical Composition and Sequence in

- Alginate by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) Spectroscopy. *ASTM International*, 10(reapproved), 1-5. <https://doi.org/10.1520/F2259-10R12E01>
- Avendaño-Romero, G. C., López-Malo, A., & Palou, E. (2013). Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 87–96.
- Ahmad, A., Ahmad, I., Ramzan, S., Kiyani, M. Z., Dubal, D. P., & Mubarak, N. M. (2021). Nanomaterial synthesis protocols. In *Nanomedicine Manufacturing and Applications*. Elsevier eBooks, 73-85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820773-4.00010-X>
- Ayarza-León, J. L. (2014). Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas. *Revista de Química PUCP*, 28(1-2), 19-23. <https://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/10413>
- Ayarza-León, J. L. (2015). Extracción y caracterización de alginato de sodio procedente del alga parda *Macrocystis* sp. En *Pontificia Universidad Católica del Perú*. <http://hdl.handle.net/20.500.12404/6443>
- Aydin, G., & Zorlu, E. B. (2022). Characterization and Antibacterial Properties of Novel Biodegradable Films Based on Alginate and Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract. *Waste and Biomass Valorization*, 13(6), 2991–3002. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01710-3>
- Azaraksh, N., Osman, A., Ghazali, H. M., Tan, C. P., & Adzahan, N. M. (2014). Lemongrass essential oil incorporated into alginate-based edible coating for shelf-life extension and quality retention of fresh-cut pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 88, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.09.004>
- Batista, A. E., Charles, M. B., Mancini-Filho, J., & Vidal, A. (2009). Seaweeds as sources of antioxidant phytomedicines. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 1–18.
- Banerjee, A., Blasiak, B., Pasquier, E., Tomanek, B., & Trudel, S. (2017). Synthesis, characterization, and evaluation of PEGylated first-row transition metal ferrite nanoparticles as: T2 contrast agents for high-field MRI. *RSC Advances*, 7(61), 38125–38134. <https://doi.org/10.1039/c7ra05495e>
- Bekin, S., Sarmad, S., Gürkan, K., Yenici, G., Keçeli, G., & Gürdağ, G. (2014). Dielectric, Thermal, and Swelling Properties of Calcium Ion-Crosslinked Sodium Alginate Film. *Polymer Engineering and Science*, 54(6), 1372–1382. <https://doi.org/10.1002/pen.23678>
- Belalia, F., & Djelali, N. W. (2014). Rheological properties of sodium alginate solutions. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(2), 135–145.
- Belattmania, Z., Kaidi, S., Atouani, S. E., Katif, C., Bentiss, F., Jama, C., Reani, A., Sabour, B., & Vasconcelos, V. (2020). Isolation and FTIR-ATR and ^1H NMR Characterization of Alginates from the Main Alginophyte Species of the Atlantic Coast of Morocco. *Molecules*, 25(18), 4335. <https://doi.org/10.3390/molecules25184335>
- Beratto, A., Agurto, C., Freer, J., Peña-Farfal, C., Troncoso, N., Agurto, A., & Castillo, R. (2017). Chemical Characterization and Determination of the Antioxidant Capacity of Two Brown Algae with Respect to Sampling Season and Morphological Structures Using Infrared Spectroscopy and Multivariate Analyses. *Applied Spectroscopy*, 71(10), 2263–2277. <https://doi.org/10.1177/0003702817715654>
- Besednova, N. N., Andryukov, B. G., Zaporozhets, T. S., Kuznetsova, T. A., Kryzhanovsky, S. P., Ermakova, S. P., Galkina, I. V., & Shchelkanov, M. Y. (2022). Molecular Targets of Brown Algae Phlorotannins for the Therapy of Inflammatory Processes of Various Origins. *Marine Drugs*, 20(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/md20040243>
- Bidarra, S. J., Barrias, C. C., & Granja, P. L. (2014). Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10(4), 1646–1662. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.006>
- Billmeyer, F. (2020). *Ciencia de los polímeros*. Reverte.

- Bishnoi, A., Kumar, S., & Joshi, N. (2017). Wide-Angle X-ray Diffraction (WXR). In *Microscopy Methods in Nanomaterials Characterization*. Elsevier eBooks, 313-337. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46141-2.00009-2>
- Blachechen, T. S., & Petri, D. F. S. (2019). Physicochemical and antimicrobial properties of in situ crosslinked alginate/hydroxypropyl methylcellulose/ε-polylysine films. *Journal Of Applied Polymer Science*, 137(26), 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.48832>
- Bonilla-Valladares, P. (2016). Formación y caracterización de nanosistemas terapéuticos con alginato. En Universitat de Barcelona. <http://hdl.handle.net/10803/400212>
- Bouissil, S., Alaoui-Talibi, Z. E., Pierre, G., Michaud, P., Modafar, C. E., & Delattre, C. (2020). Use of alginate extracted from Moroccan brown algae to stimulate natural defense in date palm roots. *Molecules*, 25(3), 720. <https://doi.org/10.3390/molecules25030720>
- Bouzidi, N., Daghbouche, Y., Hattab, M. E., Aliche, Z., Culioli, G., Piovetti, L., Garrigues, S., & De la Guardia, M. (2008). Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 616(2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.028>
- Bovey, F., & Mirau, P. (1996). The Solid-State NMR of Polymers. In *NMR Polymers* (pp. 243–352). <https://doi.org/10.1016/b978-012119765-0/50004-4>
- Brady, J. E., Durig, T., Lee, P. I., & Li, J. X. (2017). Polymer properties and characterization. In *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice: Second Edition*. Elsevier eBooks, 181-223. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802447-8.00007-8>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brus, J., Urbanová, M., Czernek, J., Pavelkova, M., Kubová, K., Vysloužil, J., Abbrent, S., Konefal, R., Horský, J., Vetchý, D., Vysloužil, J., & Kulich, P. (2017). Structure and Dynamics of Alginate Gels Cross-Linked by Polyvalent Ions Probed via Solid State NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules*, 18(8), 2478–2488. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00627>
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. (2004). Antimicrobial edible films and coatings. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833–848. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.4.833>
- Cao, N., Yang, X., & Fu, Y. (2009). Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.017>
- Carbajal, P., & Gamarra, A. (2018). Guía para recolección y reconocimiento de macroalgas pardas comerciales del Perú. *Informe IMARPE*, 45(2), 169–181. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/3292>
- Carmona, J. A., Cordobés, F., Guerrero, A., Martínez, I., & Partal, P. (2007). Influencia del pH y de la fuerza iónica sobre la gelificación térmica de proteínas de la yema de huevo. *Grasas y Aceites*, 58(3), 289–296. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i3.185>
- Carraher, C. E. (2020). *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry*. CRC Press.
- Castro, A., Carhuapoma, M., Gordillo, G., Ramos, N., Santamaría, O., Alcarraz, M., Ráez, E., & Oliveira, G. (2016). Biomasa de *Macrocystis pyrifera* (Linnapus) Agardh, composición química, actividad fotoprotectora y elaboración de productos dermocosméticos. *Científica*, 13(3), 175–186. <https://doi.org/10.21142/cient.v13i3.385>
- Catarino, M. D., Amarante, S. J., Mateus, N., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2021). Brown algae phlorotannins: A marine alternative to break the oxidative stress, inflammation and cancer network. *Foods*, 10(7), 1–27.

<https://doi.org/10.3390/foods10071478>

- Catarino, M. D., Silva, A. M. S., & Cardoso, S. M. (2017). Fucaceae: A source of bioactive phlorotannins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061327>
- Chaldun, E. R., Andayani, D. G. S., & Handayani, T. (2023). Physicochemical properties of sodium alginate from brown algae *Sargassum aquifolium* and *Sargassum cinereum*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1201(1), 012097. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1201/1/012097>
- Chandia, N. P., Matsuhira, B., & Vasquez, A. E. (2001). Alginic acids in *Lessonia trabeculata*: Characterization by formic acid hydrolysis and FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 81–87. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00286-1)
- Chandia, N. P., Matsuhira, B., Mejías, E., & Moenne, A. (2004). Alginic acids in *Lessonia vadosa*: Partial hydrolysis and elicitor properties of the polymannuronic acid fraction. *Journal of Applied Phycology*, 16(2), 127–133. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000044778.44193.a8>
- Chandini, S. K., Ganesan, P., & Bhaskar, N. (2008). In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Food Chemistry*, 107(2), 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.081>
- Cheng, H. N., & English, A. D. (2002). Advances in the NMR spectroscopy of polymers: An overview. En *ACS Symposium Series*, 3–20. <https://doi.org/10.1021/bk-2003-0834.ch001>
- Cheng, S. Y., Wang, B. J., & Weng, Y. M. (2015). Antioxidant and antimicrobial edible zein/chitosan composite films fabricated by incorporation of phenolic compounds and dicarboxylic acids. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.030>
- Cheremisinoff, N. P. (1996). *Polymer analysis. Laboratory Techniques and Analysis*. Noyes publications.
- Choi, I., Lee, S. E., Chang, Y., Lacroix, M., & Han, J. (2018). Effect of oxidized phenolic compounds on cross-linking and properties of biodegradable active packaging film composed of turmeric and gelatin. In *LWT*, 93, 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.065>
- Christodoulou, M. C., Orellana, J. C., Hesami, G., Jafarzadeh, S., Lorenzo, J. M., Domínguez, R., Moreno, A., & Hadidi, M. (2022). Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antiox11112213>
- Clare, K. (1993). Algin. *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*, Elsevier eBook, 105–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092654-4.50010-3>
- Coates, J. (2000). Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>
- Cofelice, M., Cuomo, F., & Chiralt, A. (2019). Alginate films encapsulating lemongrass essential oil as affected by spray calcium application. *Colloids and Interfaces*, 3(3). <https://doi.org/10.3390/colloids3030058>
- Cohen, D. (2016). *Contaminación por plástico, un problema global*. EFE:Verde. <https://efeverde.com/>
- Consuegra, V. A. (2014). Extracción de Antioxidantes Polifenólicos desde Macroalgas *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rigida*. En *Universidad de Chile*.
- Cui, R., Zhu, B., Yan, J., Qin, Y., Yuan, M., Cheng, G., & Yuan, M. (2021). Development of a sodium alginate-based active package with controlled release of cinnamaldehyde loaded on halloysite nanotubes. *Foods*, 10(6), 1150. <https://doi.org/10.3390/foods10061150>
- Danish, M., Mumtaz, M. W., Fakhar, M., & Rashid, U. (2017). Response surface methodology based optimized purification of the residual glycerol from biodiesel production process. *Chiang Mai Journal of Science*, 44(4), 1570–1582.
- Danielsen, S. P. O., Beech, H. K., Wang, S., El-Zaatari, B. M., Wang, X., Sapir, L., Ouchi, T., Wang, Z., Johnson,

- P. N., Hu, Y., Lundberg, D. J., Stoychev, G., Craig, S. L., Johnson, J. A., Kalow, J. A., Olsen, B. D., & Rubinstein, M. (2021). Molecular Characterization of Polymer Networks. *Chemical Reviews*, 121(8), 5042–5092. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01304>
- De Ancos, B., González-Peña, D., Colina-Coca, C., & Sánchez-Moreno, C. (2015). Uso de películas/recubrimientos comestibles en los productos De IV Y V Gama. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 8–17. <http://hdl.handle.net/10261/139238>
- De Laia, A. G. S., Junior, E. J., Souza, H.C., & Costa. (2014). A study of sodium alginate and calcium chloride interaction through films for intervertebral disc regeneration uses. En *21º CBECIMAT - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência Dos Materiais*.
- Donati, I., & Paoletti, S. (2009). *Material Properties of Alginates*. In *Alginates: Biology and Applications*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_1
- Dos Santos Caetano, K., Almeida Lopes, N., Haas Costa, T. M., Brandelli, A., Rodrigues, E., Hickmann Flôres, S., & Cladera-Olivera, F. (2018). Characterization of active biodegradable films based on cassava starch and natural compounds. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.03.006>
- Echevarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la Actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 16(1), 126–131.
- El Hariri El Nokab, M., Lasorsa, A., Sebakhy, K. O., Picchioni, F., & van der Wel, P. C. A. (2022). Solid-state NMR spectroscopy insights for resolving different water pools in alginate hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 127, 107500. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107500>
- Elbayomi, S. M., Wang, H., Tamer, T. M., & You, Y. (2021). Enhancement of antioxidant and hydrophobic properties of alginate via aromatic derivatization: Preparation, characterization, and evaluation. *Polymers*, 13(15). <https://doi.org/10.3390/polym13152575>
- Eom, S. H., Kim, Y. M., & Kim, S. K. (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food and Chemical Toxicology*, 50(9), 3251–3255. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.028>
- Escobar, D., Sala, A., Silvera, C., Harispe, R., & Márquez, R. (2009). Películas biodegradables y comestibles desarrolladas en base a aislado de proteínas de suero lácteo: estudio de dos métodos de elaboración y del uso de sorbato de potasio como conservador. *Innotec*, 4(4), 33–36. <https://doi.org/10.26461/04.07>
- Eslami, Z., Elkoun, S., Robert, M., & Adjallé, K. (2023). A Review of the Effect of Plasticizers on the Physical and Mechanical Properties of Alginate-Based Films. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186637>
- Fabia, J., Ślusarczyk, C., & Gawłowski, A. (2005). Supramolecular structure of alginate fibres for medical applications studied by means of WAXS and SAXS methods. *Fibres and Textiles in Eastern Europe*, 13(5), 114–117.
- Ahmad-Fauzi, I., & Sean, P. (2021). Functional Hybrid Nanomaterials for Environmental Remediation. En *RSC eBooks*. <https://doi.org/10.1039/9781839165283-FP005>
- Fernández-Marín, R., Fernandes, S. C. M., Sánchez, M. Á. A., & Labidi, J. (2022). Halochromic and antioxidant capacity of smart films of chitosan/chitin nanocrystals with curcuma oil and anthocyanins. *Food Hydrocolloids*, 123. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107119>
- Fernandez-Burgos, R. R. (2017). Extracción de compuestos fenólicos de la macroalga marina (*Lessonia trabeculata*), determinación de su actividad antioxidante y evaluación citotóxica. En *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*.

- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación postcosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24(3), 52–57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000300008
- Ferreira, A. R. V., Alves, V. D., & Coelho, I. M. (2016). Polysaccharide-based membranes in food packaging applications. *Membranes*, 6(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/membranes6020022>
- Fertah, M., Belfkira, A., Dahmane, E. M., Taourite, M., & Brouillette, F. (2014). Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3707–S3714. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.05.003>
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On Tyrosine and Tryptophane Determinations in Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)84277-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)84277-6)
- Fontes, G. C., Calado, V. M. A., Rossi, A. M., & Rocha-Leão, M. H. M. Da. (2013). Characterization of antibiotic-loaded alginate-OSA starch microbeads produced by ionotropic pregelation. *BioMed Research International*, 2013, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/472626>
- Ford, L., Theodoridou, K., Sheldrake, G. N., & Walsh, P. J. (2019). A critical review of analytical methods used for the chemical characterization and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis*, 30(6), 587–599. <https://doi.org/10.1002/pca.2851>
- Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I., Nishinari, K., & Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1746–1755. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014>
- Gacén, J., Maíllo, J., & Galizia, M. (2000). Peso molecular y constantes viscosimétricas de las fibras acrílicas. *Boletín Intexter (U.P.C)*, 118, 45–49.
- Gao, C., Pollet, E., & Avérous, L. (2017). Properties of glycerol-plasticized alginate films obtained by thermomechanical mixing. *Food Hydrocolloids*, 63, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.023>
- Gestión. (2023). Agroexportaciones alcanzaron nuevo récord en el 2022 al superar los US\$ 9,800 millones. <https://gestion.pe/economia/agroexportaciones-alcanzaron-nuevo-record-en-el-2022-al-superar-los-us-9800-millones-noticia/?ref=gesr>
- Gieroba, B., Kalisz, G., Krysa, M., Khalavka, M., & Przekora, A. (2023). Application of Vibrational Spectroscopic Techniques in the Study of the Natural Polysaccharides and Their Cross-Linking Process. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032630>
- Gisbert, M., Sineiro, J., & Moreira, R. (2022). Influence of Oxidation and Dialysis of Phlorotannins on Bioactivity and Composition of Ultrasound-Assisted Extracts from *Ascophyllum nodosum*. *Marine Drugs*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/md20110706>
- Giurfa, G. L., & Oblitas, J. P. (2017). Polifenoles, actividades antioxidantes, antielastasa, anticlagenasa, efecto fotoprotector de *Lessonia nigrescens* Bory y desarrollo de una forma dermocosmética. En *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Giz, A. S., Berberoglu, M., Bener, S., Aydelik-Ayazoglu, S., Bayraktar, H., Alaca, B. E., & Catalgil-Giz, H. (2020). A detailed investigation of the effect of calcium crosslinking and glycerol plasticizing on the physical properties of alginate films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.103>
- Gómez-Díaz, D., & Navaza, J. M. (2002). Caracterización Reológica De Dispersiones Agua-Alginato Sódico Con

- Aplicación En La Industria Alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(5), 302–306.
<https://doi.org/10.1080/11358120209487743>
- Gómez-Carrasco, A. G., Ramirez, S., Rodríguez, M. T. de J., & Monroy, M. (2021). Sargassum, assay to measure its antioxidant capacity and possible compounds present in the extract. *CienciaAcierta*, 68(16), 138–154.
- Gómez-Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1514–1520.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>
- Gómez, C. G., Pérez Lambrecht, M. V., Lozano, J. E., Rinaudo, M., & Villar, M. A. (2009). Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(4), 365–371.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.02.005>
- Gaitan-Espitia, J. D., & Schmid, M. (2020). Diversity, adaptation, and ecosystem services. In *Antarctic Seaweeds*. Gómez, I., Huovinen, P. (eds). https://doi.org/10.1007/978-3-030-39448-6_14
- González, B., Fuertes, C., Yauri, C., Vega, K., & para correspondencia, A. (2017). Bromophenolic compounds and antioxidant activity of red algae extracts *Polysiphonia paniculata* Montagne. *Ciencia e Investigación*, 20(1), 9–14. <https://doi.org/10.15381/ci.v20i1.14315>
- Grasdalen, H. (1983). High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations. *Carbohydrate Research*, 118, 255–260. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(83\)88053-7](https://doi.org/10.1016/0008-6215(83)88053-7)
- Grasdalen, H., Larsen, B., & Smisrod, O. (1981). ¹³C-n.m.r. studies of monomeric composition and sequence in alginate. *Carbohydrate Research*, 89(2), 179–191. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)85243-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)85243-X)
- Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). Raspberry fresh fruit quality as affected by pectin- and alginate-based edible coatings enriched with essential oils. *Scientia Horticulturae*, 194, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.004>
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2019). *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=4427
- Hanani, Z. A. N., Yee, F. C., & Nor-Khaizura, M. A. R. (2019). Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 89, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.007>
- Helgerud, T., Gåserød, O., Fjæreide, T., Andersen, P. O., & Larsen, C. K. (2009). Alginates. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*, 50–72. <https://doi.org/10.1002/9781444314724.ch4>
- Helmiyati, H., & Aprilliza, M. (2017). Characterization and properties of sodium alginate from brown algae used as an ecofriendly superabsorbent. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 188. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/188/1/012019>
- Hermund, D. B. (2018). Antioxidant properties of seaweed-derived substances. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets*. Elsevier eBooks, 201–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00010-8>
- Hernández-Carmona, G., Rodríguez-Montesinos, Arvizu-Higuera, Reyes-Tisnado R, Murillo-Álvarez, J. I., & Ochoa, M.-. (2012). Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México Technological Advance for Alginate Production in Mexico. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, 13(2), 155–168.
- Hong, T., Yin, J. Y., Nie, S. P., & Xie, M. Y. (2021). Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective. *Food Chemistry: X*, 12, 100168.
<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>

- Hunt, D., & James, M. (1993). *Polymer Characterisation*. Springer Science Business Media.
- Hurtado, A., Selgas, R., & Serrano-Aroca, Á. (2020). El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*, 12, 137–149. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.573
- IMARPE. (2023). *Catálogo digital de la biodiversidad acuática del Perú*. <https://biodiversidadacuatica.imarpe.gob.pe/>
- Imeson, A. P. (2009). Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents. In Wiley eBooks. <https://doi.org/10.1002/9781444314724>
- Iñiguez-Moreno, M., Ragazzo-Sánchez, J. A., Barros-Castillo, J. C., Solís-Pacheco, J. R., & Calderón-Santoyo, M. (2021). Characterization of sodium alginate coatings with *Meyerozyma caribbica* and impact on quality properties of avocado fruit. *LWT*, 152, 112346. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112346>
- Jadán-Piedra, F. (2017). Enzymatic browning control in cut apples (Red delicious) through a system of active packaging. *Enfoque UTE*, 8(2), 66–77. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v8n2.158>
- Jarrells, T., & Munson, E. (2022). Comparison of Differential Scanning Calorimetry, Powder X-ray Diffraction, and Solid-state Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for Measuring Crystallinity in Amorphous Solid Dispersions - Application to Drug-in-polymer Solubility. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(10), 2765–2778. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.004>
- Jaya, R. P. (2020). Porous concrete pavement containing nanosilica from black rice husk ash. In *New Materials in Civil Engineering*. Elsevier eBooks, 493–527. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818961-0.00014-4>
- Jensen, H. M., Larsen, F. H., & Engelsen, S. B. (2015). Characterization of Alginates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Vibrational Spectroscopy (IR, NIR, Raman) in Combination with Chemometrics. In *Natural Products from Marine Algae. Methods in Molecular Biology*, 1308, 347–363. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8_22
- Jiang, Y., Pang, X., Deng, Y., Sun, X., Zhao, X., Xu, P., Shao, P., Zhang, L., Li, Q., & Li, Z. (2019). An alginate hybrid sponge with high thermal stability: Its flame-retardant properties and mechanism. *Polymers*, 11(12), 1973. <https://doi.org/10.3390/polym11121973>
- Kachel-Jakubowska, M., Matwijczuk, A., & Gagoś, M. (2017). Analysis of the physicochemical properties of post-manufacturing waste derived from production of methyl esters from rapeseed oil. *International Agrophysics*, 31(2), 175–182. <https://doi.org/10.1515/intag-2016-0042>
- Kadam, S. U., Pankaj, S. K., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2015). Development of biopolymer-based gelatin and casein films incorporating brown seaweed *Ascophyllum nodosum* extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.09.003>
- Kanatt, S. R., Lahare, P., P. Chawla, S., & Sharma, A. (2015). *Kappaphycus alvarezii*: Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(1), 1–6. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.5.1.1-6>
- Karunadasa, S. (2019). Dehydration of Calcium Chloride as Examined by High-temperature X-ray Powder Diffraction. *International Multidisciplinary Research Journal*, 07–2019, 37–43.
- Kelishomi, Z. H., Goliaei, B., Mahdavi, H., Nikoofar, A., Rahimi, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Mamashli, F., & Bigdeli, B. (2016). Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. *Food Chemistry*, 196, 897–902. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.091>
- Kim, K. J., Dickson, M. R., Chen, V., & Fane, A. G. (1992). Applications of field emission scanning electron microscopy to polymer membrane research. *Micron And Microscopica Acta*, 23(3), 259–271.

[https://doi.org/10.1016/0739-6260\(92\)90029-D](https://doi.org/10.1016/0739-6260(92)90029-D)

- Kim, S., Baek, S. K., & Song, K. Bin. (2018). Physical and antioxidant properties of alginate films prepared from *Sargassum fulvellum* with black chokeberry extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.008>
- Kindleysides, S., Quek, S. Y., & Miller, M. R. (2012). Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chemistry*, 133(4), 1624–1631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.068>
- Kinh, C. D., Thien, T. V., Hoa, T. T., & Khieu, D. Q. (2007). Interpretation of ¹H-NMR spectrum of alginate by ¹H-¹H TOCSY and COSY spectrum. *Journal of Chemistry*, 45(6), 772–775.
- Koç, B., Akyuz, L., Cakmak, Y. S., Sargin, I., Salaberria, A. M., Labidi, J., İlk, S., Cekic, F. O., Akata, I., & Kaya, M. (2020). Production and characterization of chitosan-fungal extract films. *Food Bioscience*, 35, 100545. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100545>
- Kuo, C. K., & Ma, P. X. (2001). Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials*, 22(6), 511–521. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00201-5)
- Kragovic, M., Dakovic, A., Markovic, M., & Petkovic, A. (2016). Kinetic of thermal degradation of alginate-zeolite composites. *Zastita Materijala*, 57(4), 559–564. <https://doi.org/10.5937/zasmat1604559k>
- Łabowska, M. B., Michalak, I., & Detyna, J. (2019). Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field - A review. *Open Chemistry*, 17(1), 738–762. <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0077>
- Laohakunjit, N., & Noomhorm, A. (2004). Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch/Staerke*, 56(8), 348–356. <https://doi.org/10.1002/star.200300249>
- Latifi, A. M., Nejad, E. S., & Babavalian, H. (2015). Comparison of extraction different methods of sodium alginate from brown alga *Sargassum* sp. localized in the southern of Iran. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2(2), 251–255.
- Lárez-Velásquez, C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, 4(2), 91.
- Larosa, C., Salerno, M., de Lima, J. S., Merijs Meri, R., da Silva, M. F., de Carvalho, L. B., & Converti, A. (2018). Characterization of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.138>
- Leal, D., Matsuihiro, B., Rossi, M., & Caruso, F. (2008). FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweed. *Carbohydrate Research*, 343(2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.016>
- Leandro, A., Pereira, L., & Gonçalves, A. M. M. (2020). Diverse applications of marine macroalgae. *Marine Drugs*, 18(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md18010017>
- Leary, G. J., & Newman, R. H. (1992). Cross Polarization/Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (CP/MAS NMR) Spectroscopy. In *Springer series in wood science*, 146–161. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_11
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>
- Leyton, A., Pezoa-Conte, R., Barriga, A., Buschmann, A. H., Mäki-Arvela, P., Mikkola, J. P., & Lienqueo, M. E. (2016). Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis*

- pyriferas using an orthogonal experimental design. *Algal Research*, 16, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.019>
- Li, J., Wu, Y., He, J., & Huang, Y. (2016). A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films. *Journal of Materials Science*, 51(12), 5791–5801. <https://doi.org/10.1007/s10853-016-9880-0>
- Li, Y., Fu, X., Duan, D., Liu, X., Xu, J., & Gao, X. (2017). Extraction and Identification of Phlorotannins from the Brown Alga, *Sargassum fusiforme* (Harvey) Setchell. *Marine Drugs*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/md15020049>
- Lim, S. N., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., & Ang, P. O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(13), 3862–3866. <https://doi.org/10.1021/jf020096b>
- Liu, J., Meng, C. guang, Liu, S., Kan, J., & Jin, C. hai. (2017). Preparation and characterization of protocathechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*, 63, 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.035>
- Llanes, F., Sauriol, F., Morin, F. G., & Perlin, A. S. (2011). An examination of sodium alginate from *Sargassum* by NMR spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, 75(5), 585–590. <https://doi.org/10.1139/v97-069>
- Lorbeer, A. J., Lahnstein, J., Bulone, V., Nguyen, T., & Zhang, W. (2015). Multiple-response optimization of the acidic treatment of the brown alga *Ecklonia radiata* for the sequential extraction of fucoidan and alginate. *Bioresource Technology*, 197, 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.103>
- Lupo, B. (2014). Estudio de la gelificación de alginatos para encapsulación: caracterización, preparación y aplicaciones en alimentos funcionales. En *Universitat de Barcelona*. <http://hdl.handle.net/2445/64943>
- Lupo, B., González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.
- Mamani, J., Chávez, J., Apumayta, E., & Gil-Kodaka, P. (2020). Actividad antioxidante y contenido fenólico total en *Caulerpa filiformis* (Chlorophyta) de Bahía de Sechura y Bahía de Paracas, Perú. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 61–66.
- Mansilla, A., & Alveal, K. (2004). Generalidades sobre las macroalgas. *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*, 2, 346–362.
- Marcos, M. A., Cabaleiro, D., Guimarey, M. J. G., Comuñas, M. J. P., Fedele, L., Fernández, J., & Lugo, L. (2018). PEG 400-based phase change materials nano-enhanced with functionalized graphene nanoplatelets. *Nanomaterials*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/nano8010016>
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1991). Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 15(2), 171–193. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90031-7)
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejagal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., & López-Gúzman, G. G. (2017). Postcosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 4075–4087. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.674>
- Martínez, J. H. I., & Castañeda, H. G. T. (2013). Preparation and Chromatographic Analysis of Phlorotannins. *Journal of Chromatographic Science*, 51(8), 825–838. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmt045>
- Masuelli, M. A., & Illanes, C. O. (2014). Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between conventional and single point methods. *International Journal of Biomaterials Science and Engineering*, 1(1), 1–11.

- Masuelli, M. A. (2018). Intrinsic Viscosity Determination of High Molecular Weight Biopolymers by Different Plot Methods. Chia Gum Case. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry*, 6(1), 13–25. <https://doi.org/10.12691/jpbpc-6-1-2>
- Mateos, R., Pérez-Correa, J. R., & Domínguez, H. (2020). Bioactive properties of marine phenolics. *Marine Drugs*, 18(10), 501. <https://doi.org/10.3390/md18100501>
- Maulana, D. S., Mubarak, A. S., & Pujiastuti, D. Y. (2021). The Concentration of polyethylen glycol (PeG) 400 on bioplastic cellulose-based carrageenan waste on biodegradability and mechanical properties bioplastic. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 679(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/679/1/012008>
- Mayeen, A., Shaji, L. K., Nair, A. K., & Kalarikkal, N. (2018). Morphological characterization of nanomaterials. In *Characterization of Nanomaterials: Advances and Key Technologies*. Elsevier eBooks, 335-364. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101973-3.00012-2>
- McHugh, D. J., Hernández-Carmona, G., Arvizu-Higuera, D. L., & Rodríguez-Montesinos, Y. E. (2001). Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid. *Journal of Applied Phycology*, 13(6), 471–479. <https://doi.org/10.1023/A:1012532706235>
- McHugh, D. J. (2002). Prospects for the Production of Seaweed in developing countries. *FAO Fisheries Circular*, 968. <https://www.fao.org/3/y3550s/Y3550S00.htm>
- McHugh, D. J. (1987). Production and utilization of products from commercial seaweeds. *FAO Fisheries Technical Paper*, 288, 189. <http://www.fao.org/docrep/x5822e/x5822e04.htm>
- Meenakshi, S., Umayaparvathi, S., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2011). In vitro antioxidant properties and FTIR analysis of two seaweeds of Gulf of Mannar. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S66–S70. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60126-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60126-3)
- Mekinić, I. G., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., & Perković, Z. P. (2019). Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/biom9060244>
- Mohammed, A. A. B. A., Hasan, Z., Omran, A. A. B., Elfaghi, A. M., Khattak, M. A., Ilyas, R. A., & Sapuan, S. M. (2023). Effect of Various Plasticizers in Different Concentrations on Physical, Thermal, Mechanical, and Structural Properties of Wheat Starch-Based Films. *Polymers*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/polym15010063>
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Tip*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Nakagawa, H., & Oyama, T. (2019). Molecular Basis of Water Activity in Glycerol–Water Mixtures. *Frontiers in Chemistry*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00731>
- Nguyen, T. T., Thi Dao, U. T., Thi Bui, Q. P., Bach, G. L., Ha Thuc, C. N., & Ha Thuc, H. (2020). Enhanced antimicrobial activities and physiochemical properties of edible film based on chitosan incorporated with *Sonneratia caseolaris* (L.) Engl. leaf extract. *Progress in Organic Coatings*, 140, 105487. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105487>
- Nesic, A., De Bonis, M. V., Dal Poggetto, G., Ruocco, G., & Santagata, G. (2023). Microwave Assisted Extraction of Raw Alginate as a Sustainable and Cost-Effective Method to Treat Beach-Accumulated Sargassum Algae. *Polymers*, 15(14). <https://doi.org/10.3390/polym15142979>

- Nikonenko, N. A., Buslov, D. K., Sushko, N. I., & Zhabankov, R. G. (2000). Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution. *Biopolymers - Biospectroscopy Section*, 57(4), 257–262.
[https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)57:4<257::AID-BIP7>3.0.CO;2-3)
- Olate-Gallegos, C., Barriga, A., Vergara, C., Fredes, C., García, P., Giménez, B., & Robert, P. (2019). Identification of Polyphenols from Chilean Brown Seaweeds Extracts by LC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(4), 375–391. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1594483>
- Oliveira-Filho, J. G. de, Rodrigues, J. M., Valadares, A. C. F., Almeida, A. B. de, Lima, T. M. de, Takeuchi, K. P., Alves, C. C. F., Sousa, H. A. de F., Silva, E. R. da, Dyszy, F. H., & Egea, M. B. (2019). Active food packaging: Alginate films with cottonseed protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 92, 267–275.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.052>
- Oliveira, J. (2003). Estudio de la biosorción de cobre Cu(II) por perlas de Alginato de Calcio. En *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Oliveira, M. A., Gonzaga, M. L. C., Bastos, M. S. R., Magalhães, H. C. R., Benevides, S. D., Furtado, R. F., Zambelli, R. A., & Garruti, D. S. (2020). Packaging with cashew gum/gelatin/essential oil for bread: Release potential of the citral. *Food Packaging and Shelf Life*, 23(100431), 100431. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.100431>
- Orsuwan, A., Shankar, S., Wang, L. F., Sothornvit, R., & Rhim, J. W. (2016). Preparation of antimicrobial agar/banana powder blend films reinforced with silver nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 60, 476–485.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.017>
- Pal, A., Kamthania, M. C., & Kumar, A. (2014). Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds-A Review. *OALib*, 01(04), 1–17. <https://doi.org/10.4236/oalib.1100752>
- Palma-Rodríguez, H., Salgado-Delgado, R., Páramo-Calderón, D., Vargas-Torres, A., & Meza-Nieto, M. (2017). Caracterización parcial de películas biodegradables elaboradas con almidón de plátano y proteínas séricas de la leche. *Acta Universitaria*, 27(1), 26–33. <https://doi.org/10.15174/au.2017.1215>
- Pangestuti, R., Siahaan, E. A., & Kim, S. K. (2018). Photoprotective substances derived from marine algae. *Marine Drugs*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/md16110399>
- Paques, J. P., Van Der Linden, E., Van Rijn, C. J. M., & Sagis, L. M. C. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 163–171.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>
- Parreidt, T. S., Müller, K., & Schmid, M. (2018). Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods*, 7(10), 1–38. <https://doi.org/10.3390/foods7100170>
- Peng, Y., Wang, Q., Shi, J., Chen, Y., & Zhang, X. (2020). Optimization and release evaluation for tea polyphenols and chitosan composite films with regulation of glycerol and tween. *Food Science and Technology*, 40(1), 162–170. <https://doi.org/10.1590/fst.34718>
- Permatasari, A. A. A. P., Rosiana, I. W., Wiradana, P. A., Lestari, M. D., Widiastuti, N. K., Kumiawan, S. B., & Widhiantara, I. G. (2022). Extraction and characterization of sodium alginate from three brown algae collected from Sanur Coastal Waters, Bali as biopolymer agent. *Biodiversitas*, 23(3), 1655–1663.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d230357>
- Peso-Echarri, P., Frontela-Saseta, C., González-Bermúdez, C. A., Ros-Berruezo, G. F., & Martínez-Graciá, C. (2012). Polisacáridos de algas como ingredientes funcionales en acuicultura marina: Alginato, carragenato y ulvano. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 47(3), 373–381. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572012000300001>

- Phillips, & Williams. (2009). Handbook of hydrocolloids (incl. Alginates). In *Handbook of Hydrocolloids (second Edition)*.
- Qin, Y. (2018). Applications of bioactive seaweed substances in functional food products. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00006-6>
- Quitral R., V., Morales G., C., Sepúlveda L., M., & Schwartz M., M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Revista Chilena de Nutricion*, 39(4), 196–202. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>
- Ramsackal, K. N., Ward, K., & Smith, J. (2019). Determination of intrinsic viscosities and Mark-Houwink-Sakurada constants for sodium alginates. *Caribbean Science and Innovation Meeting*. <https://hal.univ-antilles.fr/hal-02899128>
- Rasid, N. A. M., Nazmi, N. N. M., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2018). Rheological, functional and antioxidant properties of films forming solution and active gelatin films incorporated with Centella asiatica (L.) urban extract. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.10.002>
- Ríos, N., Medina, G., Jiménez, J., Yáñez, C., García, M. Y., Di Bernardo, M. L., & Gualtieri, M. (2009). Antibacterial and antifungal activity from extracts of Venezuelan marine algae. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 97–100. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332009000100012
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G., & Martín-Belloso, O. (2013). Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.021>
- Rodríguez-Sauceda, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 153–170. <https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Rosales, S. (2019). Pérdida de alimentos: supera el 40% en tomate y banano en Perú, según la FAO. In *Diario Gestión*. <https://gestion.pe/peru/perdida-de-alimentos-supera-el-40-en-tomate-y-banano-desde-el-cultivo-hasta-distribucion-noticia/>
- Russo, R., Malinconico, M., & Santagata, G. (2007). Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromolecules*, 8(10), 3193–3197. <https://doi.org/10.1021/bm700565h>
- Saji, S., Hebden, A., Goswami, P., & Du, C. (2022). A Brief Review on the Development of Alginate Extraction Process and Its Sustainability. *Sustainability*, 14(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/su14095181>
- Salomonsen, T., Jensen, H. M., Larsen, F. H., Steuernagel, S., & Engelsen, S. B. (2009). Direct quantification of M/G ratio from ¹³C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution. *Carbohydrate Research*, 344(15), 2014–2022. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.06.025>
- Santos, S. A. O., Félix, R., Pais, A. C. S., Rocha, S. M., & Silvestre, A. J. D. (2019). The quest for phenolic compounds from macroalgae: A review of extraction and identification methodologies. *Biomolecules*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120847>
- Sarmiento, J. (2022). Técnicas de caracterización de polímeros. En *Universidad Nacional de Colombia*.
- Shaari, N., Kamarudin, S. K., Basri, S., Shyuan, L. K., Masdar, M. S., & Nordin, D. (2018). Enhanced mechanical flexibility and performance of sodium alginate polymer electrolyte bio-membrane for application in direct methanol fuel cell. *Journal of Applied Polymer Science*, 135(37), 1–13. <https://doi.org/10.1002/app.46666>
- Shameli, K., Ahmad, M. Bin, Jazayeri, S. D., Sedaghat, S., Shabanzadeh, P., Jahangirian, H., Mahdavi, M., & Abdollahi, Y. (2012). Synthesis and characterization of polyethylene glycol mediated silver nanoparticles by

- the green method. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(6), 6639–6650.
<https://doi.org/10.3390/ijms13066639>
- Shanura-Fernando, I. P., Asanka Sanjeeva, K. K., Samarakoon, K. W., Lee, W. W., Kim, H. S., Kim, E. A., Gunasekara, U. K., Abeytunga, D. T. U., Nanayakkara, C., De Silva, E. D., Lee, H. S., & Jeon, Y. J. (2017). FTIR characterization and antioxidant activity of water-soluble crude polysaccharides of Sri Lankan marine algae. *Algae*, 32(1), 75–86. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.12.1>
- Shin, M., Park, E., & Lee, H. (2019). Plant-Inspired Pyrogallol-Containing Functional Materials. *Advanced Functional Materials*, 29(43), 1–26. <https://doi.org/10.1002/adfm.201903022>
- Siddaramaiah, Swamy, T. M. M., Ramaraj, B., & Lee, J. H. (2008). Sodium Alginate and Its Blends with Starch: Thermal and Morphological Properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 109(6), 4075–4081. <https://doi.org/10.1002/app.28625>
- Silva, M. P., Badruddin, I. J., Tonon, T., Rahatekar, S., & Gomez, L. D. (2023). Environmentally benign alginate extraction and fibres spinning from different European Brown algae species. *International Journal of Biological Macromolecules*, 226, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.306>
- Silveira, A. C. (2017). Uso de aditivos y métodos físicos para mantener la calidad de los productos de IV gama o mínimamente procesados. *Agrociencia (Uruguay)*, 21(1), 1–6.
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S2301-15482017000100001&script=sci_abstract
- Singh, I. P., & Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural Product Reports*, 23(4), 558–591. <https://doi.org/10.1039/b600518g>
- Singh, I. P., & Sidana, J. (2013). Phlorotannins. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, 181–204. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.1.181>
- Sinjal, C. A., Rompas, R. M., Sumilat, D. A., & Suryanto, E. (2018). Antioxidant and Photoprotective Activity of Brown Seaweed from North Sulawesi Coast. *International Journal of ChemTech Research*, 11(06), 121–133. <https://doi.org/10.20902/ijctr.2018.110617>
- Sipahi, R. E., Castell-Perez, M. E., Moreira, R. G., Gomes, C., & Castillo, A. (2013). Improved multilayered antimicrobial alginate-based edible coating extends the shelf life of fresh-cut watermelon (*Citrullus lanatus*). *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.11.013>
- Solano-Doblado, L. G., Alamilla-Beltrán, L., & Jiménez-Martínez, C. (2018). Películas y recubrimientos comestibles funcionalizados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 30. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.153>
- Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O., & Cavalheiro, E. T. G. (2004). Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Ecletica Quimica*, 29(2), 57–63. <https://doi.org/10.1590/s0100-46702004000200009>
- Sperger, D. M., Fu, S., Block, L. H., & Munson, E. J. (2011). Analysis of Composition, Molecular Weight, and Water Content Variations in Sodium Alginate Using Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(8), 3441–3452. <https://doi.org/10.1002/jps.22559>
- Sperling, L. (2005). *Introduction to physical polymer science*. John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/0471757128>
- Stepanov, A. G. (2016). Basics of Solid-State NMR for Application in Zeolite Science: Material and Reaction Characterization. In *Zeolites and Zeolite-like Materials*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63506-8.00004-5>
- Storz, H., Müller, K. J., Ehrhart, F., Gómez, I., Shirley, S. G., Gessner, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V. L., Forst, T., Weber, M. M., Zimmermann, H., Kulicke, W. M., & Zimmermann, U. (2009).

- Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. *Carbohydrate Research*, 344(8), 985–995.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.02.016>
- Suderman, N., Isa, M. I. N., & Sarbon, N. M. (2018). The effect of plasticizers on the functional properties of biodegradable gelatin-based film: A review. *Food Bioscience*, 24, 111–119.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.006>
- Sui Chin, S., Han Lyn, F., & Nur Hanani, Z. A. (2017). Effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel on the physical and functional properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.008>
- Sundarrajan, P., Eswaran, P., Marimuthu, A., Subhadra, L. B., & Kannaiyan, P. (2012). One pot synthesis and characterization of alginate stabilized semiconductor nanoparticles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 33(10), 3218–3224. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2012.33.10.3218>
- Suresh, M., Iyapparaj, P., & Anantharaman, P. (2016). Antifouling Activity of Lipidic Metabolites Derived from *Padina tetrastratica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5), 805–818.
<https://doi.org/10.1007/s12010-016-2032-9>
- Swamy, T. M. M., Ramaraj, B., & Siddaramaiah. (2010). Sodium alginate and poly(ethylene glycol) blends: Thermal and morphological behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47(9), 877–881. <https://doi.org/10.1080/10601325.2010.501296>
- Tarique, J., Sapuan, S. M., & Khalina, A. (2021). Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers. *Scientific Reports*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93094-y>
- Tenorio-Rodríguez, P. A., Esquivel-Solis, H., Murillo-Álvarez, J. I., Ascencio, F., Campa-Córdova, Á. I., & Angulo, C. (2019). Biosprospecting potential of kelp (*Laminariales*, *Phaeophyceae*) from Baja California Peninsula: phenolic content, antioxidant properties, anti-inflammatory, and cell viability. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 3115–3129. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01781-1>
- Tesfay, S. Z., Magwaza, L. S., Mbili, N., & Mditshwa, A. (2017). Carboxyl methylcellulose (CMC) containing moringa plant extracts as new postharvest organic edible coating for Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 226, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.047>
- Tong, Z., Chen, Y., Liu, Y., Tong, L., Chu, J., Xiao, K., Zhou, Z., Dong, W., & Chu, X. (2017). Preparation, characterization and properties of alginate/poly(γ -glutamic acid) composite microparticles. *Marine Drugs*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/md15040091>
- Thomas, N. V., & Kim, S. K. (2011). Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 325–335.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.09.004>
- Urbanova, M., Pavelkova, M., Czernek, J., Kubova, K., Vyslouzil, J., Pechova, A., Molinkova, D., Vyslouzil, J., Vetchy, D., & Brus, J. (2019). Interaction Pathways and Structure-Chemical Transformations of Alginate Gels in Physiological Environments. *Biomacromolecules*, 20(11), 4158–4170.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01052>
- Urquiza, T. K. V., Pérez, O. P., & Saldaña, M. G. (2011). Effect of the cross-linking with calcium ions on the structural and thermo-mechanical properties of alginate films. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 1355, 16–21. <https://doi.org/10.1557/opl.2011.1136>
- Vásquez, J., Castillo, C., Zavala, J., Tejada, A., & Mamani, J. (2012). Programa de investigación de las algas pardas en el sur del Perú. En *IMARPE informe*. <https://hdl.handle.net/20.500.12958/2178>

- Vázquez-Briones, M. C., & Guerrero-Beltrán, J. A. (2013). Recubrimiento de frutas con biopelículas. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 5–14.
- Wang, Z., Zhao, S., Song, R., Zhang, W., Zhang, S., & Li, J. (2017). The synergy between natural polyphenol-inspired catechol moieties and plant protein-derived bio-adhesive enhances the wet bonding strength. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10007-8>
- Xiao, C., Weng, L., & Zhang, L. (2002). Improvement of physical properties of crosslinked alginate and carboxymethyl konjac glucomannan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, 84(13), 2554–2560. <https://doi.org/10.1002/app.10582>
- Xu, T., Gao, C. C., Feng, X., Yang, Y., Shen, X., & Tang, X. (2019). Structure, physical and antioxidant properties of chitosan-gum arabic edible films incorporated with cinnamon essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.189>
- Xu, Y., Rehmani, N., Alsubaie, L., Kim, C., Sismour, E., & Scales, A. (2018). Tapioca starch active nanocomposite films and their antimicrobial effectiveness on ready-to-eat chicken meat. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.02.006>
- Yacob, N., Yusof, M. R., Mahmud, M., Mohamed, A. Z., & Badri, K. H. (2021). Effect of Different Molecular Weight and Concentration of Polyethylene Glycol (PEG) on Tensile and Morphology of Sago Starch Film. *ASM Science Journal*, 16, 1–10. <https://doi.org/10.32802/asmscj.2021.571>
- Yu, Y. D., Raanes, M. P., & Hjelen, J. (2010). Characterization of Nonconductive Polymer Materials Using FESEM. In *International Microscopy congress IMC17*, 2(7491), 9–11.
- Zhang, D., Zhang, M., & Gu, X. (2018). Seaweed-Derived Hydrocolloids as Food Coating and Encapsulation Agents. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets*. Elsevier eBooks, 153-175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00008-X>
- Zhang, X., Ma, L., Yu, Y., Zhou, H., Guo, T., Dai, H., & Zhang, Y. (2019). Physico-mechanical and antioxidant properties of gelatin film from rabbit skin incorporated with rosemary acid. *Food Packaging and Shelf Life*, 19(2), 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.12.006>
- Zhang, Y., & Han, J. H. (2006). Mechanical and Thermal Characteristics of Pea Starch Films Plasticized with Monosaccharides and Polyols. *Journal of Food Science*, 71(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08891.x>

ANEXOS

ANEXO Nº1	RESUMEN DEL INFORME DE LA IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ALGAS PARDAS	179
ANEXO Nº2	DIAGRAMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO Y DEL ALGINATO	183
ANEXO Nº3	PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ALGINATO DE SODIO Y EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS MACROALGAS PARDAS	185

ANEXO N° 1. RESUMEN DEL INFORME DE LA IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ALGAS PARDAS



**UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
INGENIERÍA**

PROYECTO “MEJORAMIENTO Y AMPLIACIÓN DE LOS SERVICIOS DEL SISTEMA NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA”

PREPARACIÓN DE BIOPLASTICOS DE ALGINATO CON CAPACIDAD ANTIOXIDANTE A PARTIR DE MACROALGAS DE LA COSTA PERUANA, PARA SU APLICACIÓN EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

**Contrato N°01-2018-FONDECYTBM-IADTUM
Perú – 2019**

SERVICIO DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Título del entregable : Informe sobre las algas pardas herborizadas

Presentado por : Blgo. Ernesto Pariona Icochea (Consultor)

1. Objetivo

- Recolectar las algas pardas presentes en la localidad de Paracas.
- Confeccionar un herbario de las algas pardas recolectadas de Paracas.

2. Metodología

El lugar de recolección de algas pardas se localizó frente a la isla Zárate y los farallones, aproximadamente a 3.5 km al suroeste de playa Supay ($76^{\circ}17'48.10''$ L.W. y $13^{\circ}59'58.77''$ L.S.); a una profundidad aproximada de 6 metros. La recolecta fue realizada el 27 de mayo del 2019. En la zona de muestreo, se anotaron las coordenadas, haciendo uso de un GPS; se tomaron datos de profundidad, temperatura del agua de mar, tipo de sustrato, estado del mar y características del entorno físico.

El método de recolección fue realizado a través de buceo con compresora, asistido por una embarcación desde la superficie. Las algas fueron removidas del fondo, de manera manual, con una barreta, tratando de desprender individuos completos del sustrato hasta completar un peso total de 10 kg. Las muestras fueron colocadas en una bolsa de plástico y almacenadas dentro de un contenedor con hielo y refrigerantes, de esta manera se mantuvieron frescas las muestras durante el traslado al laboratorio de la facultad de ciencias.

Debido al gran tamaño de las especies recolectadas, se escogieron individuos juveniles o partes del alga para la elaboración de los herbarios mientras el resto de la carga fue destinada para la extracción de alginatos. La elaboración de los herbarios fue desarrollada de acuerdo con la metodología propuesta por (Carbajal & Gamarra, 2018). Los ejemplares fueron lavados con agua para eliminar los restos inorgánicos y epibiontes. Luego, cada ejemplar fue extendido sobre una cartulina folcote de 42,0 cm x 29,7 cm (formato A3) dejando un espacio en la esquina inferior derecha para la posterior colocación de la etiqueta del herbario. Después, la cartulina, fue cubierta con tela tocuyo y colocada entre cartones secantes (cartón prensado) para absorber la humedad y entre cartulinas corrugadas para facilitar la ventilación del montaje. Así mismo, se empleó una prensa de madera para sujetar firmemente los montajes así dispuestos. Por último, se cambió diariamente los cartones por otros secos, extrayéndose aquellos especímenes que ya se hubiesen adherido a la cartulina. Aquellas secciones que presentaron dificultad para adherirse a la cartulina fueron fijadas cuidadosamente con goma.

3. Resultados

3.1. Clasificación taxonómica

3.1.1. *Lessonia trabeculata* Villouta & Santelices 1986

La clasificación taxonómica como sigue (Guiry & Guiry, 2020):

Dominio	:	Eukaryota
Reino	:	Chromista
Phylum	:	Ochrophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Subclase	:	Fucophycidae
Orden	:	Laminariales
Familia	:	Lessoniaceae
Género	:	Lessonia
Especie	:	<i>Lessonia trabeculata</i>

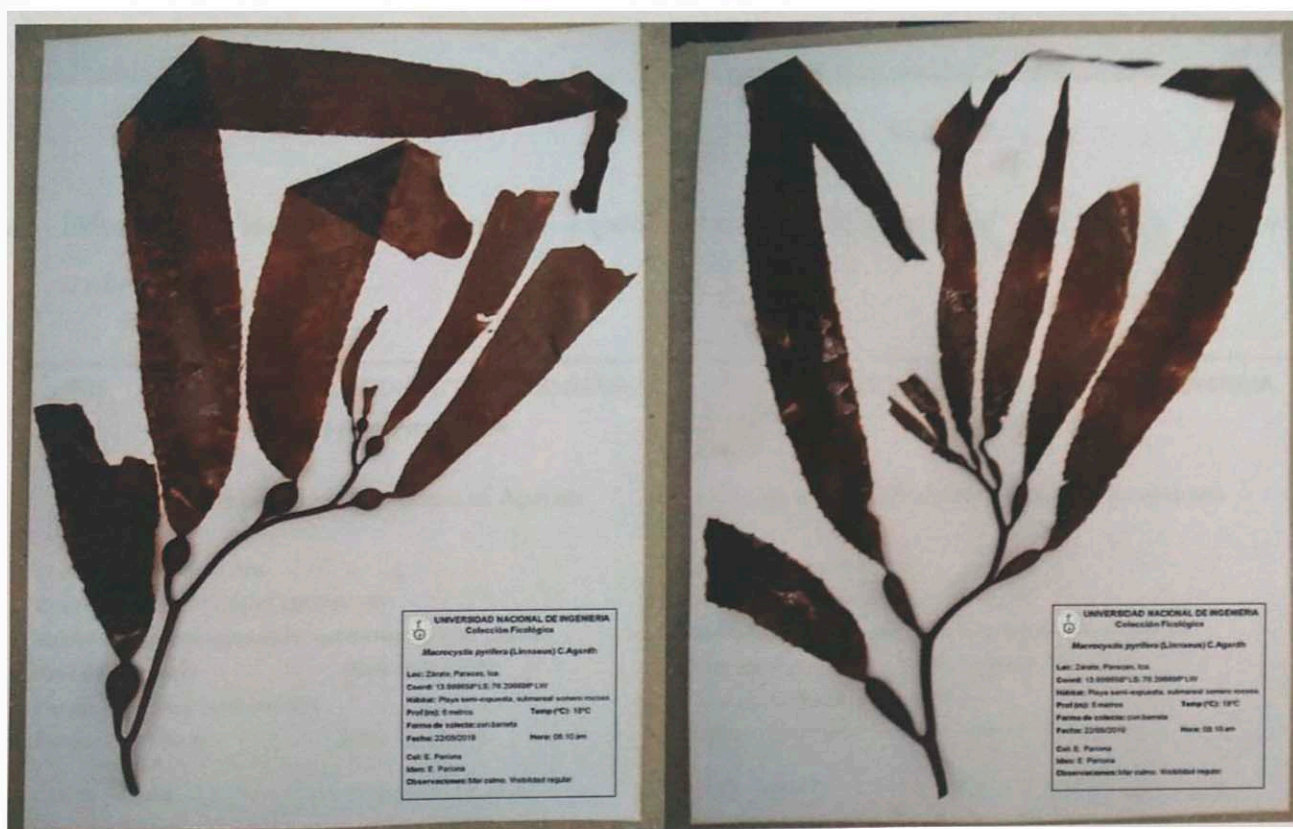
3.1.2. *Macrocystis pyrifera* (Linnaeus) C. Agardh 1820

La clasificación taxonómica como sigue (Guiry & Guiry, 2020):

Dominio	:	Eukaryota
Reino	:	Chromista
Phylum	:	Ochrophyta
Clase	:	Phaeophyceae
Subclase	:	Fucophycidae
Orden	:	Laminariales
Familia	:	Laminariaceae
Género	:	Macrocystis
Especie	:	<i>Macrocystis pyrifera</i>

3.2. Herbario de las algas pardas recolectadas

a) Especímenes de *Macrocystis pyrifera* recolectados en Paracas (Isla Zárate).



b) Especímenes de *Lessonia trabeculata* recolectados en Paracas (Isla Zárate).

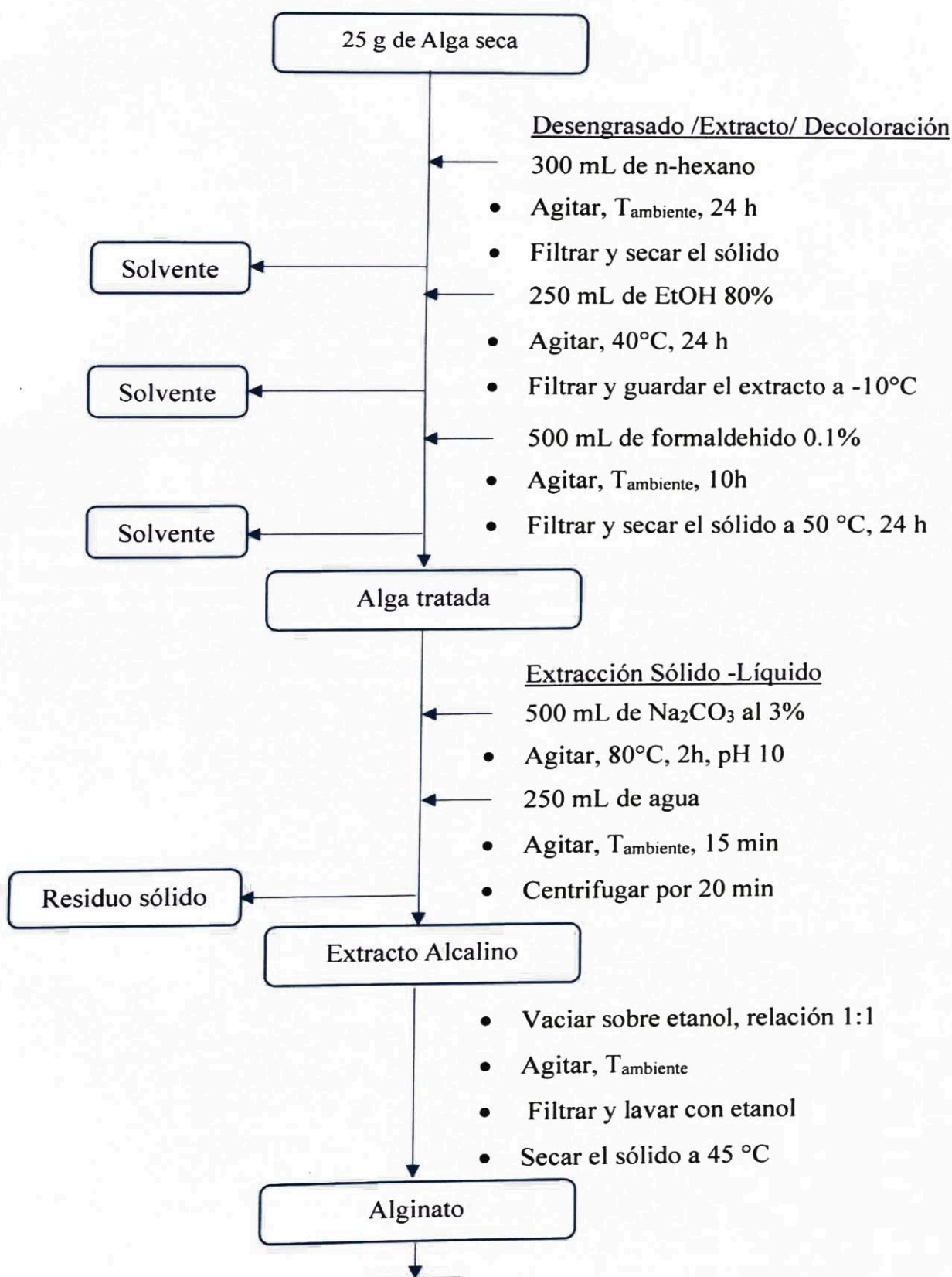


c) Detalle de las etiquetas de los especímenes de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*.

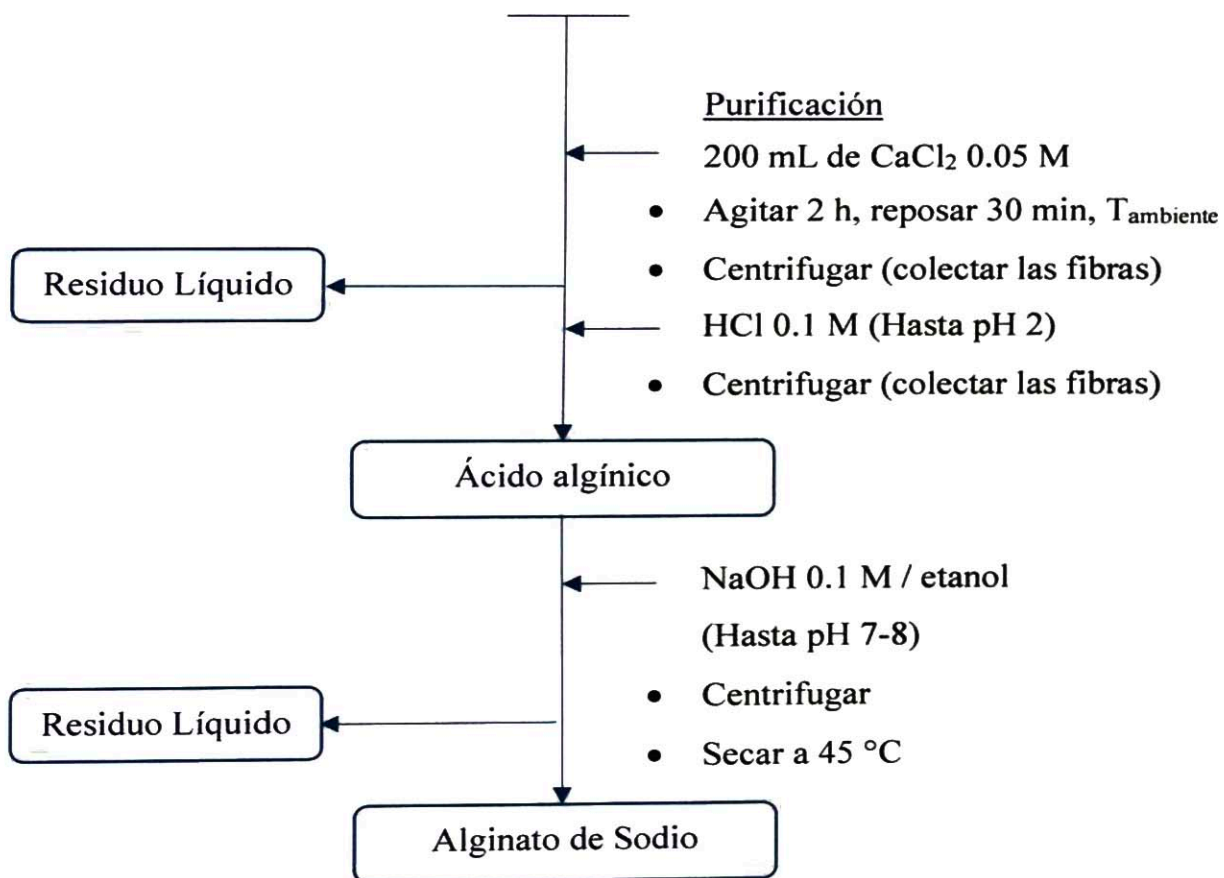
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA Colección Ficológica	
<i>Macrocystis pyrifera</i> (Linnaeus) C. Agardh	
Loc: Zárate, Paracas, Ica.	
Coord: 13.999658° LS; 76.296696° LW	
Hábitat: Playa semi-expuesta, submareal somero rocoso.	
Prof (m): 6 metros	Temp (°C): 18 °C
Forma de colecta: con barreta	
Fecha: 27/05/2019	Hora: 08:10 am
Col: E. Pariona	
Iden: E. Pariona	
Observaciones: Mar calmó. Visibilidad regular.	

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA Colección Ficológica	
<i>Lessonia trabeculata</i> Villouta & Santelices	
Loc: Zárate, Paracas, Ica.	
Coord: 13.999658° LS; 76.296696° LW	
Hábitat: Playa semi-expuesta, submareal somero rocoso.	
Prof (m): 6 metros	Temp (°C): 18 °C
Forma de colecta: con barreta	
Fecha: 27/05/2019	Hora: 08:30 am
Col: E. Pariona	
Iden: E. Pariona	
Observaciones: Mar calmó. Visibilidad regular.	

ANEXO N°2: DIAGRAMA DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL EXTRACTO Y DEL ALGINATO



(...Continuación)



ANEXO N° 3: PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ALGINATO DE SODIO Y EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS MACROALGAS PARDAS

A. TRABAJO PRELIMINAR

a) Recolección de las especies de *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata*, Paracas.



b) Almacenamiento en frío, limpieza y lavado de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata*.

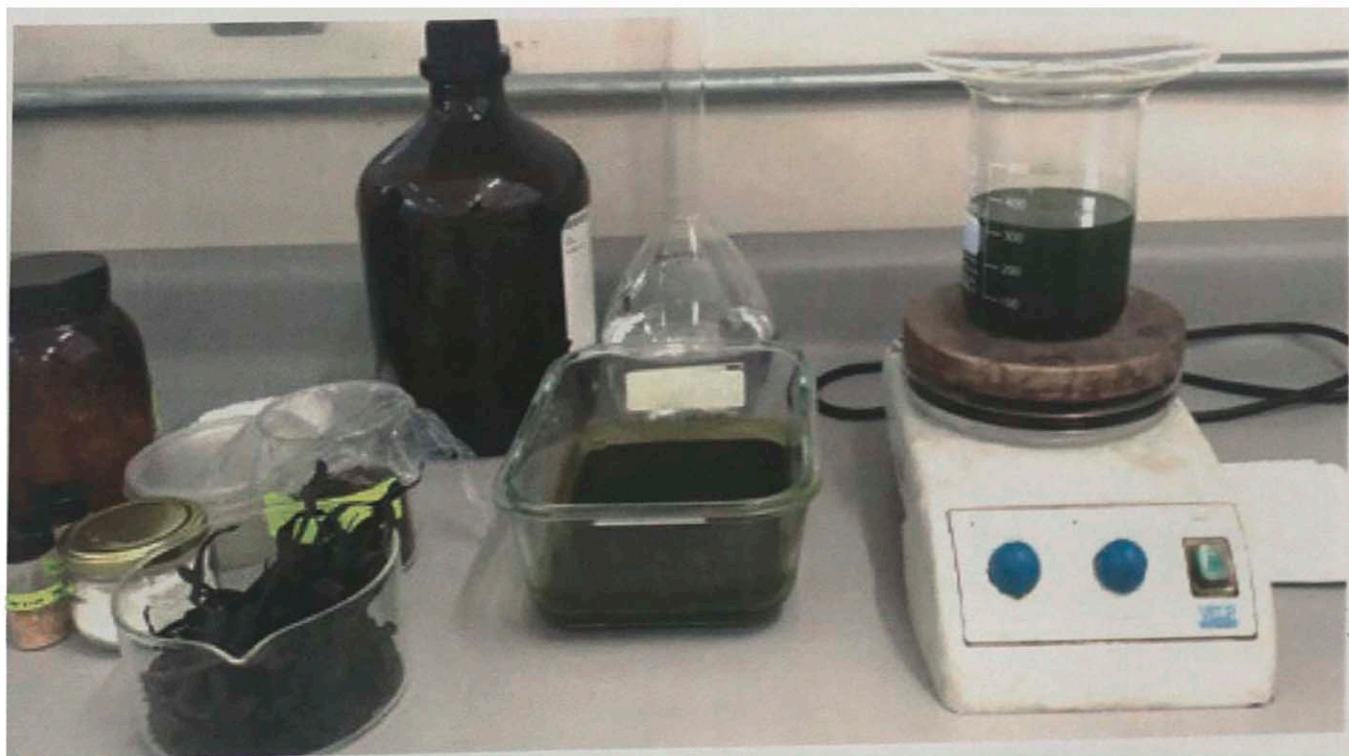


- c) Secado y molienda de las Hojas y Tallos de la especie *Macrocystis pyrifera* (izquierda) y *Lessonia trabeculata* (derecha)

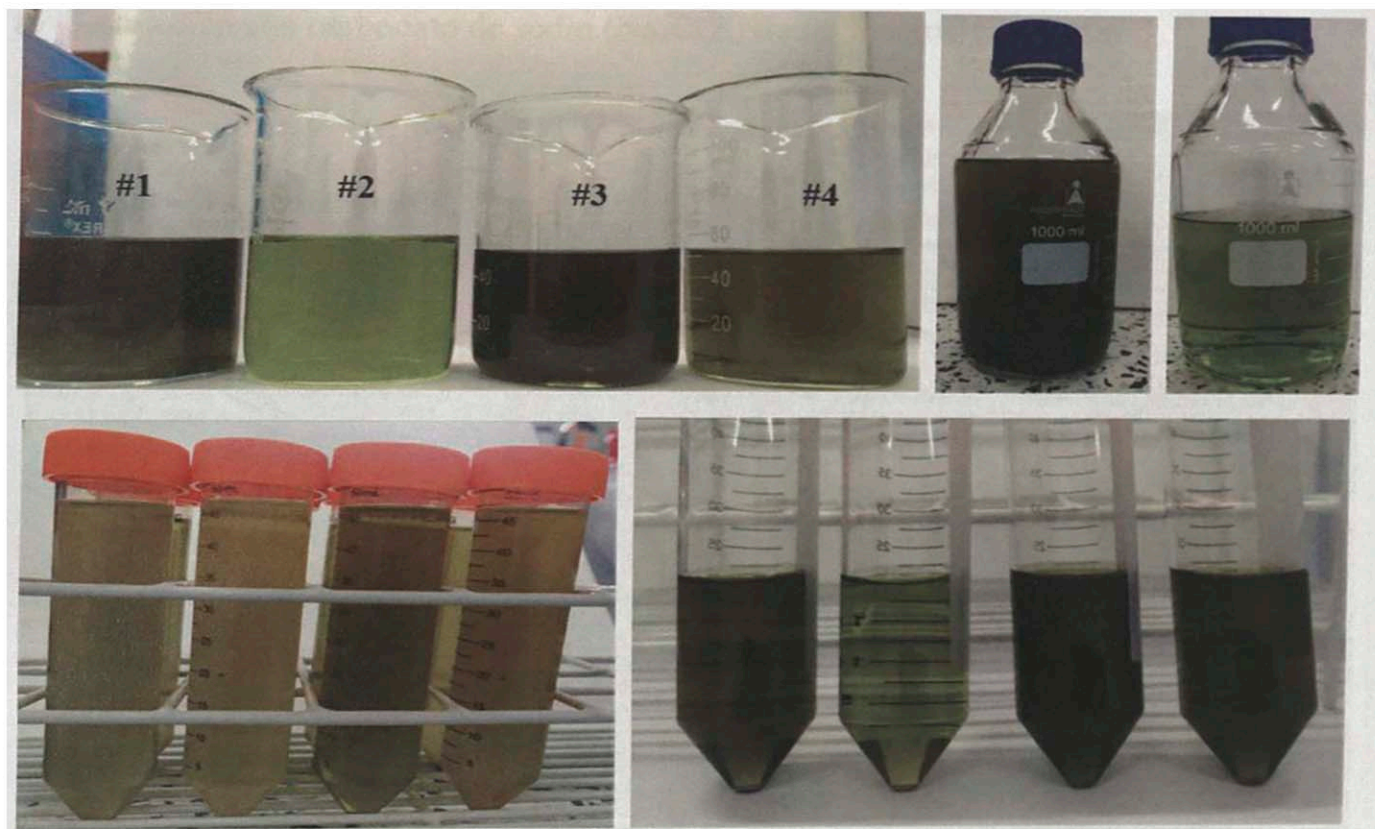


B. TRABAJO EXPERIMENTAL

1. Desengrasado con n-hexano de las macroalgas pardas



2. Obtención de los extractos hidroalcohólicos de la *M. pyrifera* y *L. trabeculata*



3. Decoloración de las muestras con formaldehído 0.1 %



4. Extracción alcalina (sólido – líquido)

a) Extracción con carbonato de sodio (Na_2CO_3) de las macroalgas pardas.



b) Separación de la biomasa (izquierda) y separación del alginato con etanol (derecha).



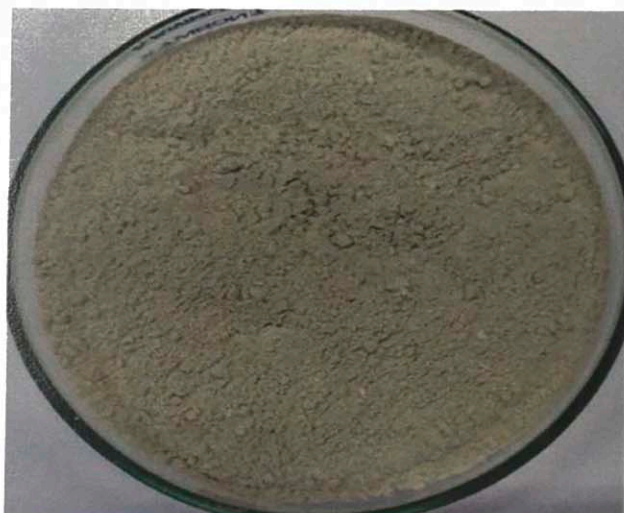
- c) Secado y molienda del alginato extraído de las macroalgas pardas de *Macrocystis pyrifera* (Izquierda) y *Lessonia trabeculata* (Derecha)



Macrocystis pyrifera



Lessonia trabeculata



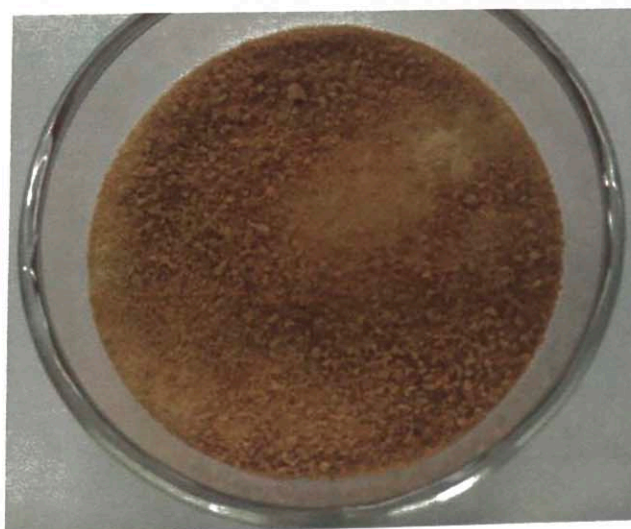
Muestra # 1 (Hojas)



Muestra # 3 (Hojas)



Muestra # 2 (Tallos)



Muestra # 4 (Tallos)