



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**INCORPORACION DE NANOFIBRA DE CELULOSA EN BIOMEDIOS
MICCROALGALES PARA FORTALECER LAS PROPIEDADES MECÁNICAS Y
ESTRUCTURALES.**

POR

ROLANDO ALBERTO VELOSO CID

Memoria de Título presentada a la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Concepción para
optar al título profesional de ingeniero Civil Químico

Profesores guías

Dra. TERESITA MARZIALETTI BERNARDI

Dr. MIGUEL PEREIRA SOTO

Agosto, 2023

Concepción (Chile)

© 2023 Rolando Veloso Cid

Sumario

Este estudio investigó el impacto de diferentes concentraciones de nanofibras de celulosa (NFC) en la estabilidad mecánica y estructural de biomédicos microalgales de alginato. Se buscó determinar la mejor concentración de NFC, entre las testeadas, que permitan mejorar las propiedades de los biomédicos.

Se realizaron pruebas preliminares para determinar la concentración máxima efectiva de nanofibras de celulosa, se evaluó la degradación del peso en biomédicos de alginato con diferentes concentraciones de NFC en agua destilada y en agua de sistemas de recirculación acuícolas y se realizaron pruebas de compresión a los estos biomédicos liofilizados. Además, se realizó una prueba de espectroscopia Raman para analizar el alginato de sodio, las NFC y compararlos con las muestras de alginato con y sin NFC.

La adición de NFC mejoró la resistencia mecánica de las muestras hasta el 10% de concentración, ya que concentraciones mayores debilitaron la estructura. La presencia de microalgas no tuvo un efecto negativo en la resistencia mecánica del alginato. El espectro Raman reveló una mayor presencia del grupo carboxilo en las muestras de alginato con NFC. Estos resultados sugieren que la incorporación de NFC en biomédicos de alginato puede mejorar sus propiedades mecánicas, pero debe optimizarse la concentración para obtener beneficios significativos.

Abstract

This study investigated the impact of different concentrations of cellulose nanofibers (CNF) on the mechanical and structural stability of alginate-based microalgal bio-carriers. The aim was to determine the optimal CNF concentration, among those tested, that would enhance the properties of the bio-carriers.

Preliminary tests were conducted to determine the maximum effective concentration of cellulose nanofibers (CNF). Weight degradation was evaluated in alginate bio-carriers with different CNF concentrations in distilled water and in water from aquaculture recirculation systems. Compression tests were performed on these freeze-dried bio-carriers. Additionally, a Raman spectroscopy test was conducted to analyze sodium alginate and CNF, comparing them with samples of alginate with and without CNF.

The addition of CNF improved the mechanical strength of the samples up to a concentration of 10%, as higher concentrations weakened the structure. The presence of microalgae did not have a negative effect on the mechanical strength of the alginate. The Raman spectrum revealed a higher presence of the carboxyl group in the alginate samples with CNF. These results suggest that the incorporation of CNF into alginate bio-carriers can improve their mechanical properties, but the concentration needs to be optimized to achieve significant benefits.

Índice de contenido

1.	Objetivos	1
1.1	Objetivo general.....	1
1.2	Objetivos generales	1
2	Introducción	2
3	Antecedentes teóricos.....	2
3.1	Microalgas y su uso en aguas residuales	2
3.2	Biomedios de alginato en sistemas de recirculación de aguas acuícolas (RAS)	3
3.3	Mecanismo de absorción de las microalgas de los biomedios en sistemas de recirculación de agua	4
3.4	Nanofibras de celulosa.....	5
3.5	Propiedades mecánicas de las NFC	6
3.6	Alginato como medio inmovilizador	7
3.7	Adición de NFC al alginato y sus propiedades.....	8
4	Metodología	8
4.1	Área de estudio	8
4.2	Formación de NFC mediante TEMPO	8
4.3	Preparación preliminar del diseño experimental.....	9
4.4	Preparación del medio de alginato.....	9
4.5	Preparación de medios de alginato de alta contracción de microalga	11
4.6	Formación de esferas de alginato.....	11
4.7	Preparación del experimento	12
4.8	Liofilización de las muestras	13
4.9	Climatización y prueba de compresión.....	14
4.10	Pruebas de espectroscopia Raman	15
5	Resultados y discusión	15
5.1	Degradación del peso en los biomedio de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada.	16
5.2	Estabilidad del alginato en función del tiempo de exposición al cloruro de calcio.	18
5.3	Prueba de compresión a los medios liofilizados de alginato con NFC.....	19

5.4	Influencia de la microalga en las pruebas mecánicas	22
5.5	Prueba de espectroscopia Raman a esferas de alginato	24
6	Conclusiones	27
7	Referencias	28
8	Anexos.....	31
	Anexo A: Tabla de mediciones de las muestras.	31
	Anexo B: Tabla de mediciones de las muestras gelificadas durante distintos intervalos de tiempo.	32
	Anexo C: Tabla de mediciones de las muestras con mayor concentración de microalgas	32
	Anexo D: Degradación del diámetro en los biomedio de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada.....	33
	Anexo E: Fuerza estándar aplicada a cada muestra durante la prueba de compresión.....	35
	Anexo F: Fuerza estándar a cada una de los quintuplicados de las muestras con alta concentración de microalga.	37

Índice de tablas

Tabla N°1. Composición de las esferas de alginato.	10
Tabla N°2. Composición de las esferas de alginato a alta concentración de microalga.	11
Tabla N°3. Composición de las esferas de alginato a diferentes tiempos de gelificación ...	12
Tabla N°4. Fuerza promedio de los medios liofilizados en agua destilada y agua RAS durante 14 días.....	19
Tabla N°5. Variación de resistencia mecánica de las muestras después de 14 días en agua RAS con respecto a las que estuvieron en agua destilada.....	22
Tabla N°6. Compresión promedio de las esferas con y sin microalga.	23
Tabla N°7. Bandas Raman típicas encontradas en celulosa, Ref: Agarwal et al., 2010.....	25
Tabla N°8. propiedades de peso y dimensión de las muestras expuestas en agua destilada y agua RAS durante distintos intervalos de días	31
Tabla N°9. propiedades de peso y diámetro de las muestras gelificadas a 1, 4 y 24 horas expuestas al agua RAS durante distintos intervalos de días.....	32
Tabla N°10. propiedades de peso y diámetro de las muestras gelificadas a 1, 4 y 24 horas expuestas al agua RAS durante distintos intervalos de días.....	32

Índice de figuras

Fig. 1: Mecanismo de absorción de nutrientes al interior de las microalgas e interacciones con bacterias. (Emparan, et al. 2018)	4
Fig. 2: Oxidación regioselectiva del hidroxilo C6 de la celulosa a grupos carboxilato C6 mediante oxidación TEMPO/NaBr/NaClO en agua a pH 10-11 (Isogai et al., 2010).	6
Fig. 3: Estructura química de los monómeros de alginato: el ácido D-mannurónico (M) y el ácido L-gulurónico (G) (Ching et al., 2017).....	7
Fig. 4: Estructura molecular del alginato interactuando con un catión calcio.....	7
Fig. 5: PANDA GEA plus utilizado durante la homogeneización.	9
Fig. 6: Formación de medios de alginato.	10
Fig. 7: Equipo utilizado para la formación de esferas de alginato.	12
Fig. 8: Las ocho muestras de esferas de alginato en agua destilada y agua	13
Fig. 9: “Freeze dry system” usado durante la liofilización operando a 0,01 Bar y a -43°C. 14	
Fig. 10: Equipo de compresión Shimadzu utilizado durante la prueba de compresión.....	15
Fig. 11: Degradación del peso de los biomedios liofilizados de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua destilada.....	16
Fig. 12: Degradación del peso de los biomedios de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua RAS.....	17
Fig. 13: Degradación del peso de los biomedios liofilizados de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua RAS.	17
Fig. 14: Cambio de la estabilidad en agua RAS de los medios de alginato con 10% de NFC gelificados a distintas horas	18
Fig. 15: Ensayo de compresión de las muestras a distintas concentraciones de NFC en agua destilada y agua RAS durante 14 días.	21
Fig. 16: Compresión de las muestras con y sin concentración de microalga	23
Fig. 17: Espectro Raman de los materiales utilizados	24

Fig. 18: Cambio del diámetro de los medios de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada durante 14 días	33
Fig. 19: Cambio del diámetro de los medios de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua RAS durante 14 días.....	34
Fig. 20: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 5 muestras medidas que estuvieron en agua destilada	35
Fig. 21: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 5 muestras medidas que estuvieron en agua RAS.....	36
Fig. 22: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 4 muestras con alta concentración de microalgas que estuvieron en agua RAS.....	37

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de incorporar nanofibras de celulosa a biomedios microalgales de alginato sobre las propiedades mecánicas y estructurales para extender su vida útil.

1.2 Objetivos generales

- Formular biomedios microalgales de alginato (BAA) incorporando nanofibras de celulosa (NFC).
- Examinar las propiedades mecánicas y morfológicas de los formulados de biomedio con NFC.
- Identificar el o los formulados que beneficien la estabilidad mecánica y estructural de los biomedios extendiendo su vida útil dentro de los biofiltros.

2 Introducción

En la acuicultura y tratamiento de aguas de recirculación es fundamental garantizar un ambiente adecuado y saludable para el desarrollo de las especies acuáticas. Los biofiltros desempeñan un gran papel para la eliminación de sustancias contaminantes que puedan eutrofizar el agua o causar daño a la vida acuífera; sin embargo, los biomedios suplementados con microalga y bacterias se encuentran expuestos a factores que deterioran su estructura, el estrés hidráulico y la presencia de contaminantes como nitratos nitritos, fosfatos y gases disueltos provenientes del desecho de los peses y residuos de alimentos de los sistemas de recirculación (RAS); suelen degradarse y debilitar la estructura de los biomedios afectando en su rendimiento. La incorporación de nanofibras de celulosa a los biomedios se presenta como una alternativa para mejorar sus propiedades mecánicas y estructurales, y por consecuencia su vida útil. Para alcanzar este objetivo en esta memoria de título se desarrollaron formulaciones modificando el contenido de NFC y las condiciones de preparación de los biomedios para obtener esferas (biomedios microalgales) que permitan extender su vida útil dentro de los biofiltros, reduciendo costos operacionales, aumentando la eficiencia de agotamiento de contaminantes y los beneficios medioambientales de la industria acuícola chilena.

3 Antecedentes teóricos

3.1 Microalgas y su uso en aguas residuales

El agua residual generadas por actividades acuícolas están altamente contaminadas por altas concentraciones de nitratos, fosfatos y compuestos de carbono, lo que impacta negativamente en la cadena alimenticia (Tom et al., 2021). Durante la crianza de peces, los desechos y el alimento no consumido se convierten en fuentes significativas de contaminación, liberando grandes cantidades de nitrógeno y fósforo a los cuerpos de agua circundantes. Estos nutrientes en exceso pueden tener efectos negativos en la calidad del agua y conducir a problemas ambientales como la eutrofización (Das et al., 2004) Normalmente, para obtener 1 kg de biomasa de peces, se requiere entre 1 y 3 kg de alimento seco. Sin embargo, gran parte de este alimento no es consumido por los peces y termina disolviéndose en el agua o depositándose en el fondo del estanque o acuario (Crab et al., 2007).

Los tratamientos químicos para el tratamiento de aguas residuales en la acuicultura suelen ser demasiado costosos y generan residuos químicos no deseables; por otro lado, el tratamiento con microalgas demuestra ser una forma más económica y efectiva de eliminar el nitrógeno (N) y el fósforo (Mook et al., 2012). A diferencia del uso de bacterias que producen CO₂, las microalgas utilizan estas especies como nutrientes para crecer y convertirse en biomasa útil como alimento para peces o fertilizantes agrícolas. (Taelman et al., 2013). Además, su uso en el tratamiento de aguas residuales acuícolas aumenta el oxígeno en el agua, beneficiando a las especies acuáticas (Milhazes-Cunha, 2017).

3.2 Biomedios de alginato en sistemas de recirculación de aguas acuícolas (RAS)

Los sistemas de recirculación de agua (RAS, por sus siglas en inglés) se diseñan con el propósito de reducir el constante cambio y reemplazo de agua en las unidades de cultivo de peces, y resultan muy útiles tanto en acuicultura comercial como en acuarios y proyectos a pequeña escala. Estos sistemas se encargan de mantener una adecuada calidad del agua mediante diferentes procesos; que incluyen la aireación, la eliminación de materia particulada, la regulación del pH, control de temperatura y la filtración biológica a mediante bacterias o microalgas para eliminar amoníaco, nitrito, nitratos y fosfatos (McGee et al., 2000).

El empleo de sistemas de recirculación de agua posibilita el cultivo de peces a altas densidades, gracias a la utilización de biofiltros y un flujo continuo de agua recirculante, lo que garantiza un suministro óptimo de oxígeno a los peces y, al mismo tiempo, elimina el amoníaco y el nitrito (Rosy et al., 2009). Estos biofiltros pueden ser de dos tipos: los biofiltros de medio fijo, donde los microorganismos se adhieren y crecen en un medio proporcionado, y los biofiltros de lodo único, donde tanto el lodo como los microorganismos se mantienen en suspensión (Gutierrez-Wing & Malone, 2006).

Una estrategia beneficiosa para los biomedios microbianos consiste en la inmovilización de las células dentro de una matriz polimérica tridimensional, como el alginato. Esto ofrece una protección temporal a las células contra posibles cambios degenerativos del entorno, promueve una mayor carga celular localizada y evita altas tasas de dilución o lavado de inóculo debido al proceso de irrigación continua (Lin et al., 2010).

3.3 Mecanismo de absorción de las microalgas de los biomedios en sistemas de recirculación de agua

Las microalgas son efectivas eliminando compuestos inorgánicos como el nitrato, fosfato, metales pesados, carbono inorgánico, sustancias tóxicas (orgánicas e inorgánicas), DBO, DQO y otras impurezas disueltas en los sistemas de aguas RAS. La Figura 1 muestra el proceso de absorción y utilización de nutrientes dentro de la microalga. El fosfato es asimilado por las microalgas mediante un proceso llamado fosforilación, en la cual transforman el fosfato en difosfato de adenosina, molécula clave, que mediante fotosíntesis crean sus moléculas para sintetizar energía (ATP y NADPH). Durante el proceso de asimilación del nitrato, las microalgas transforman el nitrato a nitrito y luego a amonio, reduciendo todas las moléculas inorgánicas de nitrógeno en amonio, molécula esencial para la formación de aminoácidos que forman parte de las enzimas, proteínas y clorofilas (Emparan, et al. 2018).

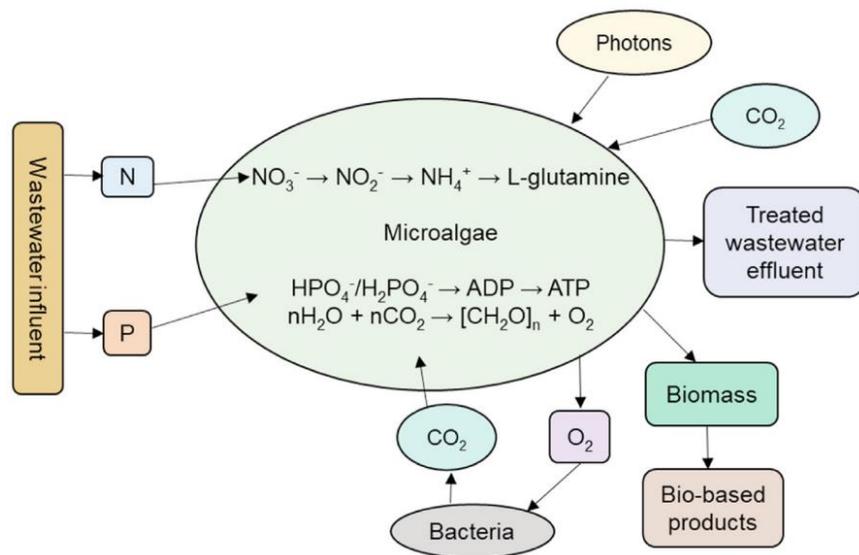


Fig. 1: Mecanismo de absorción de nutrientes al interior de las microalgas e interacciones con bacterias.
(Emparan, et al. 2018)

Mediante el mecanismo de absorción de nutrientes las microalgas liberan una cantidad sustancial de oxígeno que es consumido por otros microorganismos, reduciendo la demanda bioquímica de oxígeno (BOD por sus siglas en inglés) en aguas residuales. Los resultados han demostrado que la eficiencia de remoción de BOD es superior al 80% (Ghazal, 2018).

Debido a que las aguas de los sistemas de recirculación en la acuicultura tienen altas concentraciones de amonio y nitratos, las microalgas pueden suplementarse de estas para formar un ambiente apto para la crianza de peces.

3.4 Nanofibras de celulosa

La celulosa es un polímero que puede ser obtenido de diversas fuentes, como la madera, semillas, hierbas, algas, invertebrados y bacterias. Sin embargo, actualmente, la madera es la fuente más importante de celulosa. Además de celulosa, la madera contiene hemicelulosa, lignina y una cantidad menor de sales inorgánicas. La celulosa es el principal componente responsable de la fuerza estructural en las células que forman las fibras (Nechyporchuk et al., 2016).

Las nanofibras de celulosa (NFC) tienen una estructura similar a una aguja y sus dimensiones varían según la fuente de fibra y el método de extracción, generalmente con diámetros inferiores a 30 nm y longitudes superiores a 100 nm (Qua et al., 2011).

El proceso de producción de NFC implica una serie de operaciones que se llevan a cabo en la pasta de celulosa previamente purificada mediante cocción y blanqueo. La pasta de celulosa se somete a un pretratamiento, que puede ser tanto biológico como químico, con el objetivo de facilitar la separación mecánica de las fibras de celulosa. Algunos de los métodos más utilizados incluyen hidrólisis enzimática, carboxilación, carboximetilación, cuaternización, sulfonación y pretratamiento asistido por solventes.

Luego, se realiza una desintegración mecánica de las fibras de celulosa utilizando procesos como homogeneización, molienda, refinación, extrusión, ultrasonido, criptotrituración y contracolisión acuosa. La combinación de estas operaciones determina el tipo de NFC formada, y como resultado, existen más de 50 tipos de NFC (Nechyporchuk et al., 2016) siendo una de las técnicas más usadas la oxidación usando TEMPO.

La oxidación TEMPO consiste en oxidar la celulosa de la madera usando el radical 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxilo provocando la conversión química de los grupos hidroxilo alcohólicos a aldehídos, cetonas y grupos carboxilos. El propósito de usar esta técnica de obtención de NFC es el consumo menor de energía en comparación a otras técnicas, y los

grupos carboxilos producen repulsión electrostática favoreciendo la desfibrilación (Zhao et al., 2017)

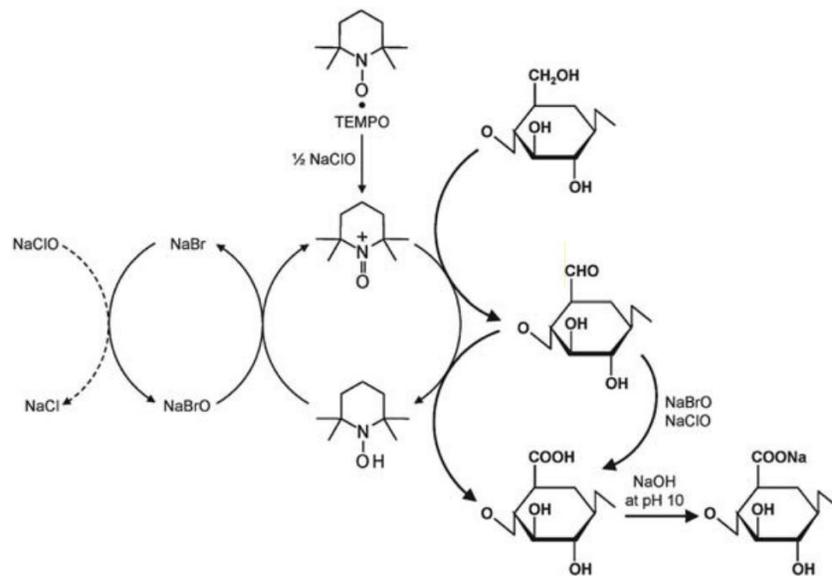


Fig. 2: Oxidación regioselectiva del hidroxilo C6 de la celulosa a grupos carboxilato C6 mediante oxidación TEMPO/NaBr/NaClO en agua a pH 10-11 (Isogai et al., 2010).

En este sistema se disuelven cantidades catalíticas de TEMPO y NaBr en soluciones de polisacáridos a pH 10-11 y la oxidación se inicia mediante la adición de una solución NaClO como agente oxidante primario. La conversión del grupo hidroxilo primario se sugiere de acuerdo con el mecanismo mostrado en la figura 2 (Isogai et al., 2010).

En las últimas décadas los polímeros reforzados con NFC y sus derivados atraen la atención de muchos científicos debido a sus propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas.

3.5 Propiedades mecánicas de las NFC

Las NFC pueden formar estructuras flexibles filamentosas que pueden experimentar una deformación plástica considerable sin romperse y alta resistencia mecánica, convirtiéndolos en buenos refuerzos para mejorar estas propiedades en materiales compuestos (Li et al., 2014), por ejemplo en la literatura, un estudio centrado en analizar el efecto de las NFC como refuerzo en resina epoxi concluye que una dispersión y distribución homogénea de las NFC contribuye en una mejora en la resistencia y rigidez de la resina, además la interacción entre

los grupos hidroxilo de las NFC y los grupos polares de la resina epoxi favorece una mayor adhesión (Saba et al., 2017).

3.6 Alginato como medio inmovilizador

El uso del alginato tiene múltiples usos, por ejemplo, en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica como agente emulsionante en aplicaciones médicas como hidrogeles, esponjas y, recientemente, en mats electrohilachados para la aceleración de regeneración de músculos. (Cheng et al., 2020)

El alginato es un polímero que está compuesto por dos monómeros, el ácido D-mannurónico (M) y el ácido L-gulurónico (G); la estructura del alginato consiste en unidades lineales, sin ramificaciones, formada por la secuencia de monómeros M y G.

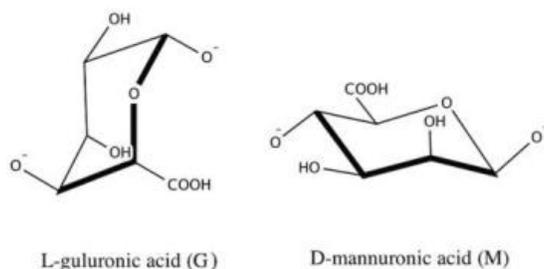


Figura N°:

Fig. 3: Estructura química de los monómeros de alginato: el ácido D-mannurónico (M) y el ácido L-gulurónico (G) (Ching et al., 2017)

El alginato tiene la capacidad de interactuar con diferentes cationes, y presenta una alta afinidad por los cationes calcio (Ca), estroncio (Sr) y el Bario (Ba) siendo estos los cationes más utilizados para formar geles iónicos (Ching et al., 2017).

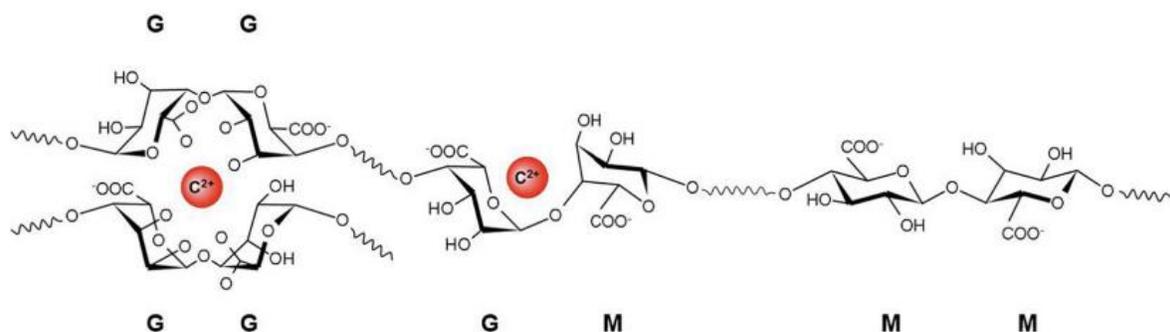


Fig. 4: Estructura molecular del alginato interactuando con un catión calcio (Hu et al., 2017)

Cada uno de los iones de calcio se unen a las secuencias G (ácido L-gulurónico) mediante enlace iónico con del alginato, formando una red tridimensional estable al calor con forma de “caja de huevos” obteniendo la forma típica el alginato, como se muestra en la Figura 4 (Fu et al., 2017). Los alginatos ricos en cantidad de bloques G tienden a gelificar de forma más rápida, con uniones más fuertes que los alginatos ricos en bloques M formando geles más rígidos y quebradizos, mientras que los geles de alginato ricos en bloques M tienden a ser más elásticos y deformables (Chourpa et al., 2000).

3.7 Adición de NFC al alginato y sus propiedades

Para aumentar las propiedades mecánicas del alginato se ha intentado mezclar con diferentes tipos de refuerzos orgánicos, inorgánicos y metálicos (Abdul et al., 2017), entre estas, las NFC son un refuerzo orgánico ampliamente utilizado debido a su alta elasticidad y su nanoescala. Por ejemplo, en un estudio se prepararon membranas multicapa utilizando alginato de sodio a distintas concentraciones de NFC, mostrando en sus pruebas que las películas con NFC tuvieron mayor opacidad y permeabilidad reducida al vapor de agua, además tener mayor resistencia mecánica, efecto que se debilitó al aumentar la concentración de NFC (Xiao et al., 2021).

4 Metodología

4.1 Área de estudio

El presente estudio de investigación tuvo lugar en el laboratorio de Biomasa y Catálisis en el departamento de ingeniería civil química de la Universidad de Concepción, Chile; Este departamento ofrece un entorno idóneo para llevar a cabo experimentos, gracias a la disponibilidad de equipos y materiales especializados que resultaron fundamentales para la realización exitosa de los experimentos.

4.2 Formación de NFC mediante TEMPO

Fig 1: Para la formación de NFC con una concentración 1% p/v se agregaron 25g de pulpa en base seca en 2,5 litros de agua y se dejó la mezcla durante un día remojando para facilitar la reacción. Mediante un agitador se agito durante 15 minutos para disgregar, en paralelo se pesa y se mezclan 0,25g de KBr y 0,04g de TEMPO (las cantidades de KBr y TEMPO

corresponden a 0,1g de KBr y 0,0016g de TEMPO por gramo de celulosa respectivamente). Se adiciono la mezcla a la pulpa al 1% dejando agitar durante 15 minutos más y junto a un electrodo de medición de pH se añade hipoclorito de sodio poco a poco de manera que el pH se mantuvo en 10, etapa que duro 1 hora aproximadamente. Una vez terminada la reacción se lavó la pulpa con agua destilada mediante una bolsa de género y se pasó la pulpa dos veces por un homogeneizador PANDA GEA Plus (Figura 5).



Fig. 5: PANDA GEA plus utilizado durante la homogeneización.

4.3 Preparación preliminar del diseño experimental

Se llevó a cabo un estudio experimental preliminar con el propósito de establecer la cantidad máxima de nanofibras de celulosa (NFC) que podían incorporarse exitosamente en los medios de alginato. Para lograr esto, se prepararon cinco muestras con concentraciones variables de NFC: 5%, 10%, 15%, 20% y 25%.

4.4 Preparación del medio de alginato

Para la formación de las soluciones de alginato de sodio se utilizó agua destilada, alginato de sodio de marca REGON Chem. Group, nanofibras de celulosa y microalgas. Fueron 3 las concentraciones de NFC estudiadas, 0%, 5%, 10% y 15% y se consideró una muestra sin NFC como muestra control. La Tabla 1 muestra la cantidad de masa y volumen utilizados en cada una de las muestras junto con sus respectivas nomenclaturas.

Tabla N°1. Composición de las esferas de alginato.

Muestra	Porcentaje de NFC	Agua destilada (ml)	Alginato de sodio (g)	Volumen de NFC 1% p/v (ml)	Volumen Microalga (ml)
M1	Sin NFC	300	6	0	2
M2	5% NFC	285	6	15	2
M3	10% NFC	270	6	30	2
M4	15% NFC	255	6	45	2

Para la preparación de cada muestra, se procedió a calentar agua destilada en cuatro vasos precipitados utilizando placas calefactoras hasta alcanzar una temperatura de 60°C, mientras se agitaba vigorosamente. Luego, se añadieron gradualmente 6 gramos de alginato de sodio a cada muestra para evitar la formación de grumos difíciles de disolver. Las mezclas fueron calentadas a 90°C durante 20 minutos para lograr una completa disolución del alginato.

A continuación, se incorporó la nanofibra de celulosa a 1% p/v en las cantidades correspondientes a cada muestra mediante el uso de una jeringa, manteniendo la temperatura a 90°C y la agitación durante otros 20 minutos para asegurar una distribución homogénea.

Las muestras fueron dejadas en reposo durante 24 horas a temperatura ambiente para permitir la eliminación de las burbujas de aire formadas durante la agitación. Finalmente se incorporó un volumen de 2 ml de microalga a cada muestra.

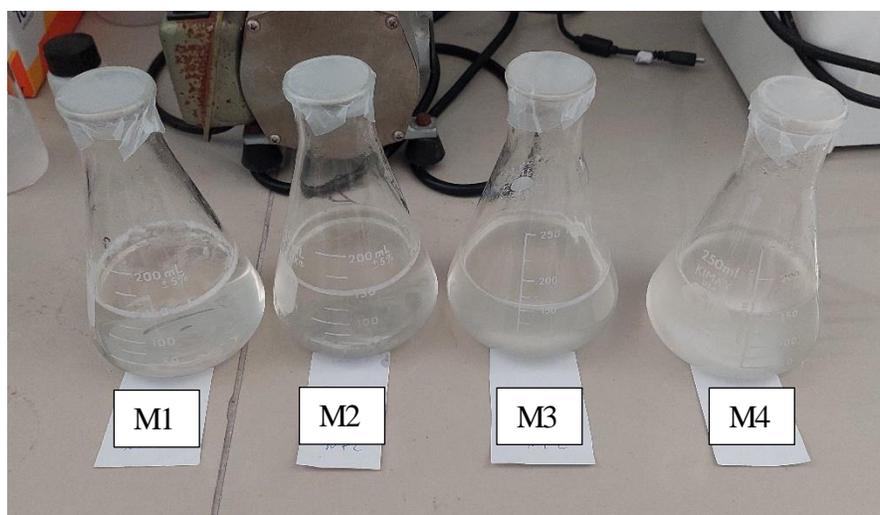


Fig. 6: Formación de medios de alginato. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC, M4:15% NFC.

En la Figura 6 se observan las soluciones formadas con alginato y NFC, de izquierda a derecha están las soluciones M1, M2, M3 y M4 desde 0% a 15% de NFC, a mayor concentración de NFC más blanquecina y espesa se vuelve la solución.

4.5 Preparación de medios de alginato de alta contracción de microalga

Para asegurar el crecimiento de microalga y estudiar las consecuencias de estas en el medio, se prepararon muestras con mayor concentración de microalga utilizando la misma metodología anterior, esta vez con un volumen de 6 ml de microalga. La Tabla 2 muestra la cantidad de masa y volumen utilizada en cada una de las muestras junto con sus respectivas nomenclaturas.

Tabla N°2. Composición de las esferas de alginato a alta concentración de microalga.

Muestra	Porcentaje de NFC	Agua destilada (ml)	Alginato de sodio (g)	Volumen de NFC 1% p/v (ml)	Volumen Microalga (ml)
M1-2	Sin NFC	300	6	0	6
M2-2	5% NFC	285	6	15	6
M3-2	10% NFC	270	6	30	6
M4-4	15% NFC	255	6	45	6

4.6 Formación de esferas de alginato

Luego de preparar las soluciones de alginato con y sin NFC, se procedió al proceso de goteo de forma individual para cada muestra. Cada muestra se introdujo en una bureta (Figura 7) y se goteó en una solución de cloruro de calcio para lograr la gelificación. La solución de cloruro de calcio se preparó con una concentración del 10% peso/volumen; las muestras se dejaron gelificar durante 4 horas, lo que permitió que las esferas de alginato decanten y adquirieran una buena consistencia.

Una vez transcurridas las 4 horas, se extrajeron las esferas de alginato y se lavaron con abundante agua destilada para eliminar cualquier residuo de la solución de cloruro de calcio.



Fig. 7: Equipo utilizado para la formación de esferas de alginato.

Para estudiar el impacto de la exposición del cloruro de calcio en el medio de alginato, se volvieron a realizar muestras con 10% de NFC, con la diferencia de que se mantuvieron gelificando durante 1 hora, 4 hora y 24 horas en la solución de cloruro de calcio, la Tabla 3 muestra la nomenclatura.

Tabla N°3. Composición de las esferas de alginato a diferentes tiempos de gelificación.

Muestra	% NFC	Horas de gelificación (horas)
M3-1H	10	1
M3-4H	10	4
M3-24H	10	24

4.7 Preparación del experimento

Para estudiar la influencia del tipo de agua en las esferas de alginato, se cultivaron las microalgas dentro de los medios de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada y agua RAS. En cuatro vasos precipitados, se agregó 200 ml de agua destilada, mientras que en otros cuatro vasos se añadieron 200 ml de agua RAS. Posteriormente, se introdujeron doscientas esferas de alginato en cada uno de los vasos precipitado, generando así cuatro muestras de alginato en agua destilada y cuatro muestras en agua RAS (Figura 8).

Las muestras de la Tabla 1 se extrajeron en los 0, 1, 3, 6, 9 y 14 días, mientras que las muestras de las Tablas 2 y 3 se extrajeron en los 0, 7 y 14 días. Después cumplidos los días se retiraron

las muestras, se lavaron con agua destilada y se secaron con un paño cuidadosamente para eliminar el exceso de agua. Luego, se midieron sus masas y diámetros.

Una vez completadas las mediciones, las muestras fueron almacenadas en una ampolla de muestras y congeladas en un refrigerador a -4°C .

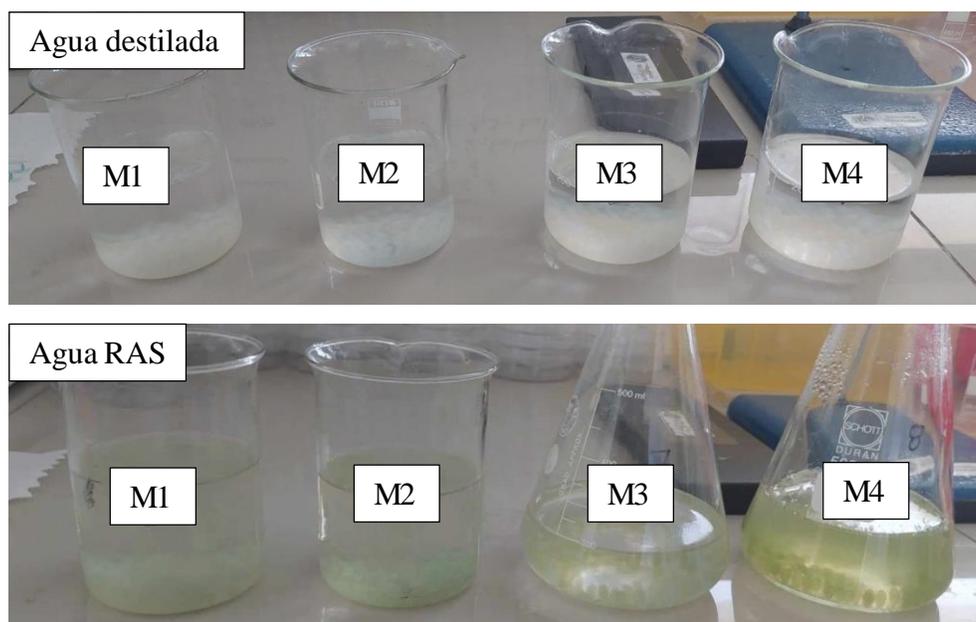


Fig. 8: Las ocho muestras de esferas de alginato en agua destilada y agua RAS. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC M4:15% NFC.

4.8 Liofilización de las muestras

Es necesario liofilizar las muestras para las pruebas de compresión, por lo que las muestras se llevaron al congelador que opera a una temperatura de -80°C , donde se mantuvieron durante 2 días hasta alcanzar dicha temperatura. Posteriormente, las muestras fueron sometidas al proceso de liofilización utilizando un equipo de marca LABCONCO "freeze dry system" mostrada en la Figura 9 durante 24 horas, con una temperatura aproximada de -40°C y una presión de 0,01 bar.

Es necesario asegurar un correcto secado de las muestras por lo que el proceso de liofilización duró 24 horas, momento en el cual las muestras fueron retiradas del equipo y se procedió a medir sus masas y diámetros. Luego, se colocaron en un desecador para mantenerlas libres de humedad.



Fig. 9: “Freeze dry system” usado durante la liofilización operando a 0,01 Bar y a -43°C.

4.9 Climatización y prueba de compresión

Las muestras liofilizadas, se sometieron a pruebas de compresión para evaluar su resistencia mecánica. Previo a las pruebas, las muestras se mantuvieron en una sala climatizada a una temperatura de 25°C y una humedad del 50% durante un período de 24 horas. Esto se hizo para asegurar que las muestras alcanzaran condiciones ambientales estables antes de realizar las pruebas de compresión.

Las pruebas de compresión se llevaron a cabo utilizando un equipo de compresión Shimadzu EZ-SX (Figura 10); que permitió medir la resistencia mecánica de las esferas de alginato con nanofibras de celulosa a diferentes concentraciones. El objetivo de estas pruebas fue estudiar el efecto de la presencia o ausencia de las nanofibras de celulosa en la estructura y resistencia de las esferas de alginato.



Fig. 10: Equipo de compresión Shimadzu EZ-SX utilizado durante la prueba de compresión.

4.10 Pruebas de espectroscopia Raman

Con el objetivo de investigar las estructuras moleculares de las muestras, se realizó un análisis de espectroscopia Raman, en el laboratorio de materiales híbridos y polímeros, departamento de ingeniería de materiales, para averiguar de qué forma interactúan las NFC con el alginato gelificado. Para esto hay que comparar las espectroscopias de las materias primas y de las muestras, por esto, fue necesario efectuar la prueba de espectroscopia Raman a cuatro muestras, al alginato de sodio en polvo; a las NFC y a dos muestras correspondientes a la M1 (sin NFC) y a la M4 (con 15% de NFC).

5 Resultados y discusión

Los resultados obtenidos de las pruebas preliminares indicaron que la máxima concentración de NFC que se pudo añadir de manera efectiva fue del 15%. Al aumentar la concentración de NFC por encima de este valor, la solución de alginato con NFC adquirió una viscosidad considerable, lo que afectó negativamente su capacidad para escurrir de manera adecuada, incapacitando la posibilidad de crear esferas de una forma homogénea.

Se presentan los datos de pesos y diámetros de las muestras de la tabla 1, tabla 2 y tabla 3 en el anexo A, B y C.

5.1 Degradación del peso en los biomedio de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada.

Todas muestras reflejan una disminución importante de su masa durante el primer día de la experimentación, seguida por una curva relativamente constante después del día 6. La muestra M3 preservó una mayor cantidad de masa en el día 14; con una pérdida del $23 \pm 2\%$ de su masa seguido por las muestras M2 y M4, con pérdidas de masa de $28 \pm 4\%$ y $29 \pm 3\%$, y la muestra M1 tuvo una pérdida del $32 \pm 4\%$ siendo la cual más pérdida de masa tuvo. La Figura 11 muestra la degradación del medio de alginato en porcentaje de peso. Caso similar sucede con el diámetro tal como se ve en el Anexo D.

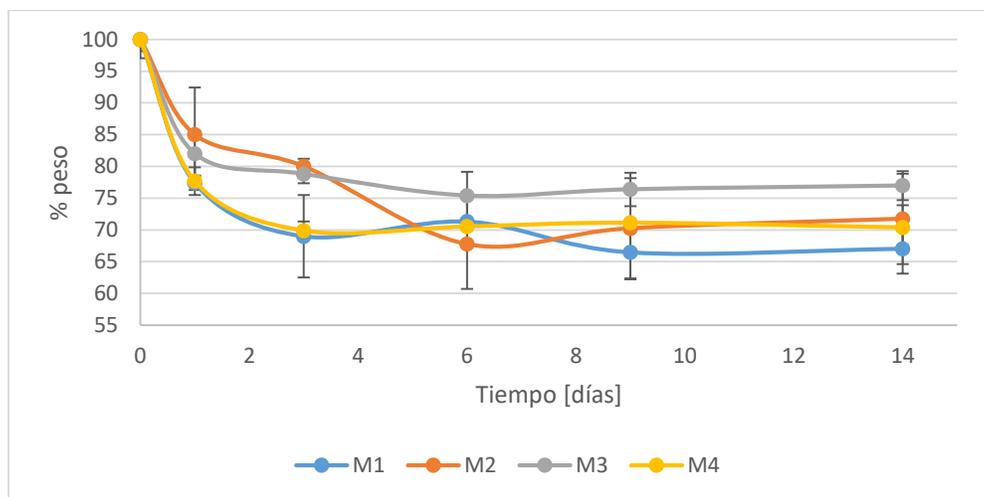


Fig. 11: Degradación del peso de los biomedios liofilizados de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua destilada. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC M4:15% NFC

Al igual que los biomedios expuestos al agua destilada, en agua RAS (Figura 12) se observó una disminución importante de masa de los biomedios expuestos al agua RAS durante el primer día de experimentación seguido por una curva relativamente constante desde el día 3 hasta el día 14. El peso de las muestras M1, M3 y M4 en el día 14 están dentro de la dispersión de cada una de ellas. Las muestras tuvieron menos pérdida de masa fueron M2 y M3 con una pérdida del $23 \pm 4\%$ y $25\% \pm 2\%$ respectivamente seguido por las muestras M1 y M4 con una pérdida del $28 \pm 1\%$ y $32 \pm 2\%$ de su masa respectivamente. En promedio la pérdida de masa en agua destilada fue del $28 \pm 3\%$ mientras que en agua RAS fue del $27 \pm 2\%$.

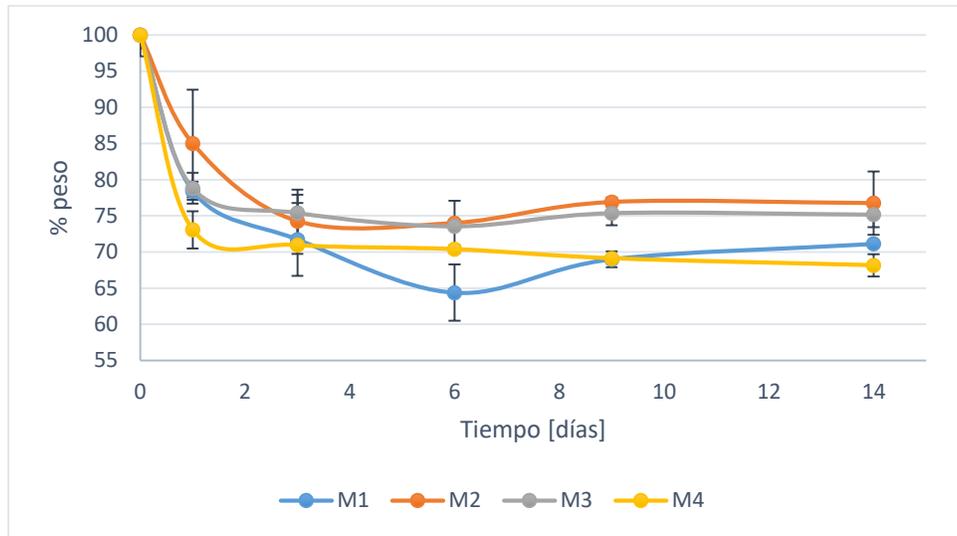


Fig. 12: Degradación del peso de los biomédicos de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua RAS. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC M4:15% NFC.

Tal y como se reporta en la literatura, cuando los iones Ca^{2+} que estaban unidos al alginato se liberan, causan que las redes del alginato de calcio no puedan retener su estructura y las estructuras se debiliten (Voo et al., 2015). Esto sugiere que parte de la estructura inicial de las esferas de alginato se debilitó perdiendo capacidad de retener agua. Para tener mejor referencia, la Figura 13 muestra la masa de las muestras liofilizadas en agua RAS.

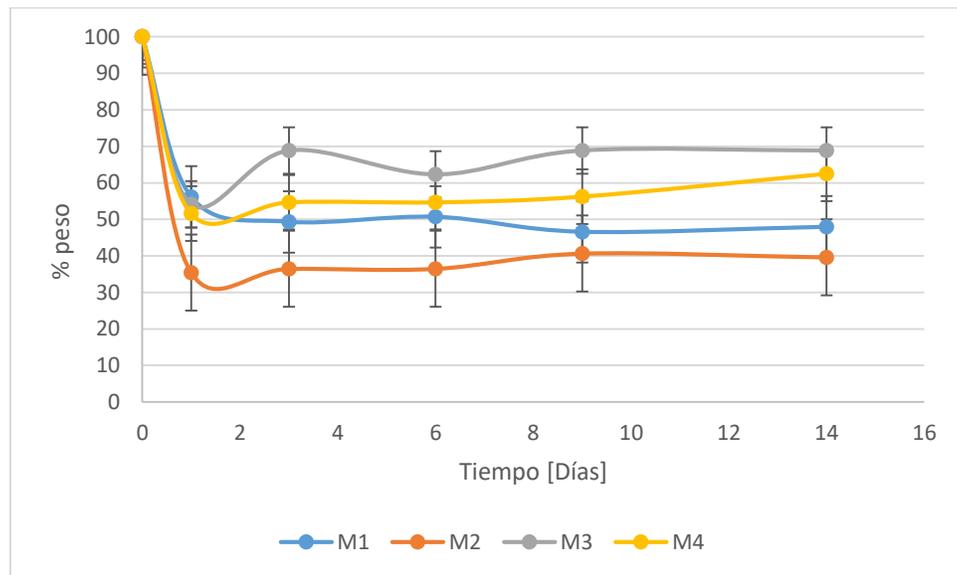


Fig. 13: Degradación del peso de los biomédicos liofilizados de alginato a distintas concentraciones de NFC durante 14 días de exposición al agua RAS. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC M4:15% NFC.

Se puede observar el mismo patrón, con la diferencia de que los biomédicos liofilizados perdieron en promedio el 45 % de su masa, por lo tanto, el alginato al verse debilitado sus enlaces no solo pierde capacidad de retener agua, sino que también se desprende y se disuelve en el agua. Sin embargo, esto sucede durante los primeros días ya que después del día tres las esferas mantienen su masa y capacidad de retención de agua.

5.2 Estabilidad del alginato en función del tiempo de exposición al cloruro de calcio.

Las propiedades físicas medidas a los medios gelificados a distintos intervalos de tiempo se muestran en el anexo B. Los biomédicos de alginato que fueron gelificados en cloruro de calcio a 1 hora, 4 horas y 24 horas en agua RAS que aparecen en la Figura 14 evidencian la fuerte disminución de su masa durante los primeros días, lo cual era esperable, tal como sucedió anteriormente. La Muestra M2-4H retuvo una mayor cantidad de agua al término de los 14 días, con una pérdida de masa del 31 ± 1 % a diferencia de las muestras de M2-1H y M2-24H que tuvieron pérdidas de $39\% \pm 2$ y $40\% \pm 1$ de su masa respectivamente al término de 14 días.

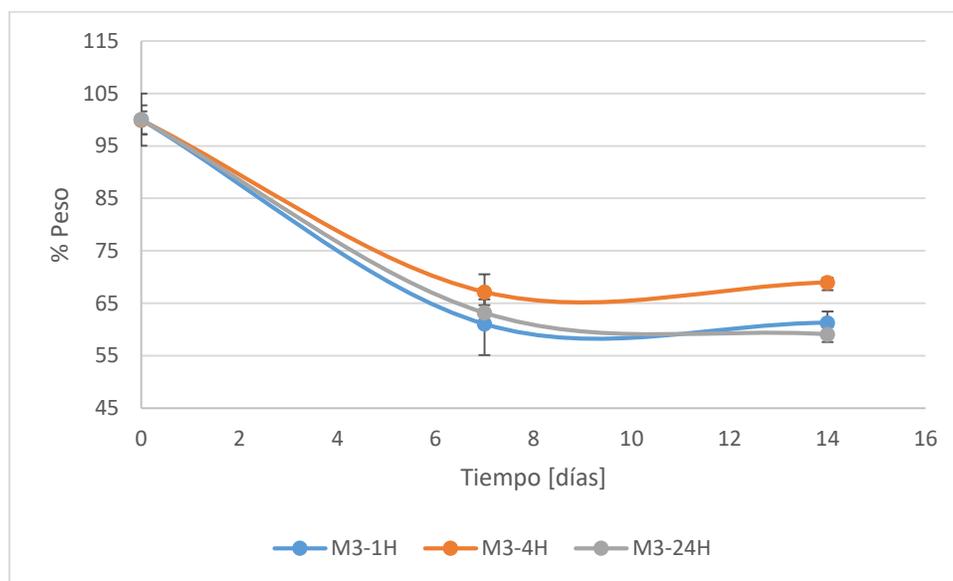


Fig. 14: Cambio de la estabilidad en agua RAS de los medios de alginato con 10% de NFC gelificados a distintas horas. M3-1H: 1 hora M3-4H: 4 horas, M3-24H: 24 horas.

Es probable que la diferencia en el peso entre las muestras M3-1H y M3-4H se haya originado debido a una reacción incompleta con el ion Ca^{2+} durante el proceso de gelificación en la solución de cloruro de calcio afectado negativamente el desarrollo de una estructura estable y bien desarrollada en la muestra de M3-1H, en comparación con la muestra de M3-4H horas. Como resultado, la estructura interna de la muestra de M3-1H podría haber sido menos compacta y menos efectiva para retener agua.

La imprevista disminución del peso en la muestra de 24 horas se puede aludir a que la muestra de 24 horas al estar bastante tiempo en la solución de cloruro de calcio puede formar contracción de su estructura interna, deshidratación del polímero y disminuir su permeabilidad (Julian et al., 1988), disminuyendo su capacidad de retener agua.

5.3 Prueba de compresión a los medios liofilizados de alginato con NFC

Se llevaron a cabo pruebas mecánicas con el propósito de investigar el efecto de las nanofibras de celulosa en la estabilidad de las esferas liofilizadas de alginato al exponerlas al agua destilada y agua RAS por 14 días.

Los promedios de los valores obtenidos de las pruebas se presentan en la Tabla N°4. En el caso de la muestra M2, se registra un aumento del 10% en la fuerza requerida para comprimir las esferas con respecto a M1 en agua destilada y un aumento del 8% en agua RAS, además de ser la muestra con mayor promedio de fuerza de compresión.

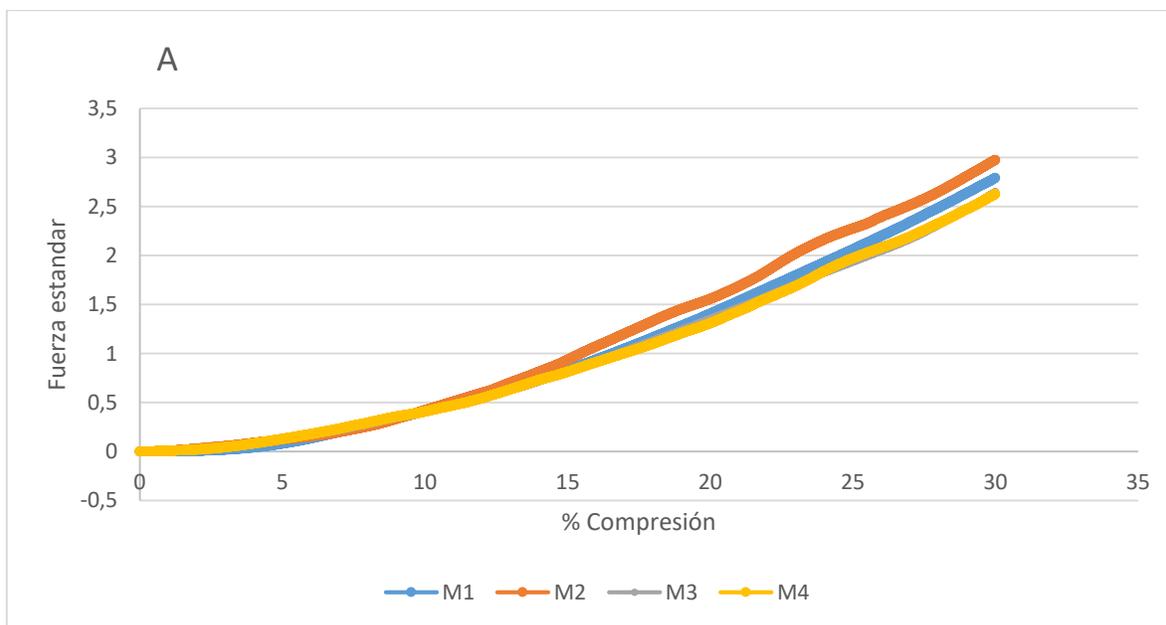
Tabla N°4. Fuerza promedio de los medios liofilizados en agua destilada y agua RAS durante 14 días.

Muestra	Tipo de agua	Porcentaje NFC (%)	Fuerza promedio hasta 30% de compresión (N)
M1	Destilada	0	1,02
	RAS	0	0,71
M2	Destilada	5	1,12
	RAS	5	0,88
M3	Destilada	10	1,08
	RAS	10	0,74
M4	Destilada	15	1.02
	RAS	15	0,67

Es importante mencionar que el equipo utilizado para medir la fuerza de las estructuras está diseñado específicamente para comprimir estructuras con forma cilíndrica, lo que implica

que la fuerza entregada por este equipo no se corresponde directamente con la fuerza ejercida sobre las esferas utilizadas. Por lo tanto, fue necesario realizar un ajuste en los datos, tomando en consideración el área transversal de las esferas, para obtener valores comparables y significativos. El Anexo E muestra los resultados de la compresión de las muestras de forma individual.

Los gráficos presentados en la Figura 15 muestran la fuerza estándar promedio aplicada a cada una de las muestras del Anexo 4. Se decidió graficarlos hasta un 30% de compresión debido a que en ese rango la resistencia de las muestras es generada por la morfología de su estructura interna y no por la fuerza normal generada por el acoplamiento de alginato.



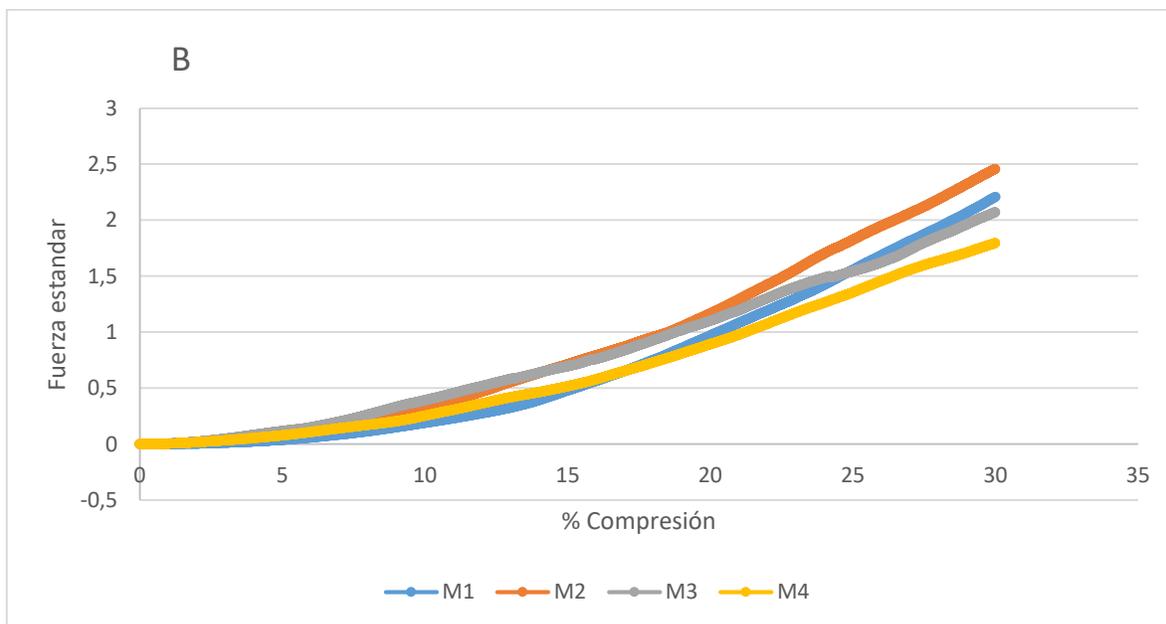


Fig. 15: Ensayo de compresión de las muestras a distintas concentraciones de NFC en A) agua destilada y B) agua RAS durante 14 días, M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC M4:15% NFC.

De los resultados obtenidos, se observa que las muestras M2 y M3 liofilizadas tuvieron, en general, una mayor resistencia tanto en agua destilada como en agua RAS durante todo el periodo de compresión. Es interesante ya que la adición de nanofibra de celulosa favorece la resistencia de la estructura hasta cierta concentración, ya que tal como se ve con la muestra M4, la estructura parece debilitarse a mayores concentraciones de NFC.

El promedio de la fuerza ejercida sobre todas las muestras en agua destilada fue de 0.31 N, mientras que en agua RAS fue de 0.26 N, lo que representa una reducción del 18% de fuerza. Esto sugiere que hubo una mayor degradación estructural en las esferas al estar expuestas a este medio debido a una mayor concentración de contaminantes disueltos en agua RAS que pueden reaccionar con el alginato, alterando sus propiedades mecánicas.

Las muestras con algún porcentaje de NFC (M2, M3 y M4) y en agua RAS, mostraron una reducción promedio del 19% de su resistencia mecánica en comparación con aquellas que estuvieron en agua destilada, tal como muestra la Tabla 5

Tabla N°5. Variación de resistencia mecánica de las muestras después de 14 días en agua RAS con respecto a las que estuvieron en agua destilada.

Muestras	Porcentaje de variación de compresión en agua destilada con respecto a agua RAS
M1	21
M2	14
M3	14
M4	32

En cambio, la muestra sin NFC (M1) y en agua RAS experimentan una disminución de resistencia mecánica del 21% en comparación con las muestras en agua destilada, destacando el efecto favorable de la incorporación de NFC. La concentración de contaminantes del agua RAS junto con la alta concentración de NFC hicieron que la muestra M4 tenga un 32% de pérdida de resistencia mecánica en agua RAS con respecto a las que estaban en agua destilada.

5.4 Influencia de la microalga en las pruebas mecánicas

De todas las muestras analizadas, se observó que solo el 2% de las esferas presentaron un crecimiento notable de microalgas, específicamente correspondientes a la muestra M3-2. Estas muestras fueron sometidas a pruebas mecánicas con el propósito de evaluar el efecto de las microalgas en la estructura de la esfera de alginato. La Figura 16 muestra una comparación de la fuerza de compresión aplicada a estas muestras. Los resultados de cada una de las muestras se presentan en el Anexo F

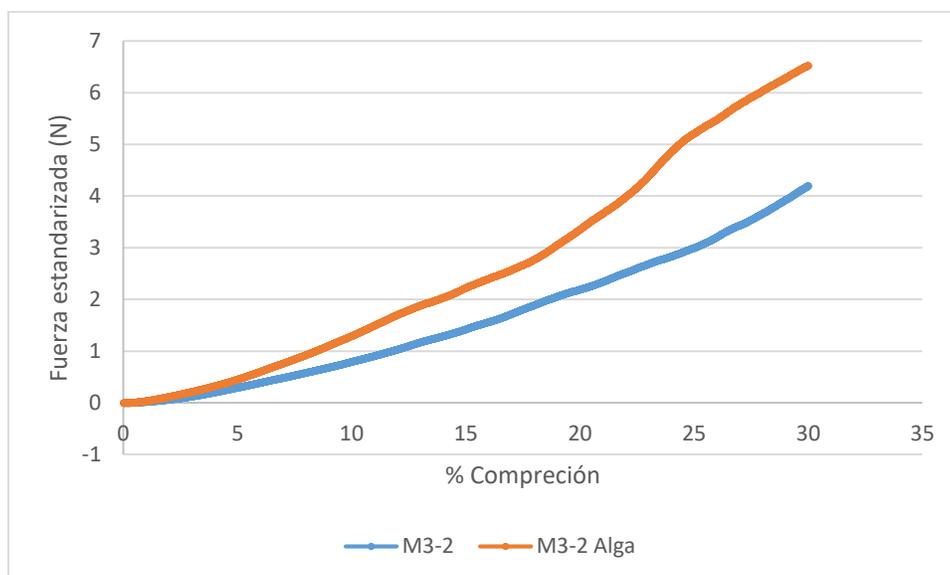


Fig. 16: Compresión de las muestras con y sin concentración de microalga. M3-2: esferas 10% NFC, M3-2 ALGA: esferas 10% NFC con alta concentración de microalga.

Los resultados obtenidos revelan que la resistencia mecánica de las esferas de alginato con mayor presencia de microalgas es mayor en comparación con las esferas de alginato sin ellas. Esto sugiere un impacto positivo de la presencia de microalgas en la estructura de las esferas de alginato. En la Tabla 6 se detallan los valores promedio de la fuerza requerida para comprimir las muestras. Se pudo observar que la muestra con mayor concentración de microalga es aproximadamente un 61% más resistente que la muestra con menor presencia de microalga, además de tener un peso de muestra liofilizada mayor, lo que evidencia la presencia de microalga en la estructura.

Tabla N°6. Compresión promedio de las esferas con y sin microalga.

Muestra	Concentración de microalga	Peso liofilizado (mg)	Fuerza promedio hasta 30% de compresión (N)
M3-2	baja	2	0,47
M3-2 ALGA	alta	3	1,01

Estos hallazgos sugieren que la presencia de microalgas no debilita la estructura de las esferas de alginato, tal como se evidencia en la literatura, la presencia de la microalga *C. vulgaris* dentro de los medios de alginato no tiene efecto en la resistencia del gel que forman los medios durante la incubación durante 96 horas (Cruz et al., 2013). Posiblemente el aumento

en la fuerza de compresión se deba a que el medio al tener mayor concentración de microalgas, se hayan adherido a la estructura durante el proceso de liofilización, por lo que no es correcto mencionar que la estructura de alginato sea más resistente en presencia de microalga.

5.5 Prueba de espectroscopia Raman a esferas de alginato

Los resultados de la prueba de espectroscopia Raman de las muestras de alginato de sodio, la nanofibra de celulosa y las esferas de alginato gelificadas con y sin nanofibra de celulosa se presentan en la Figura 17.

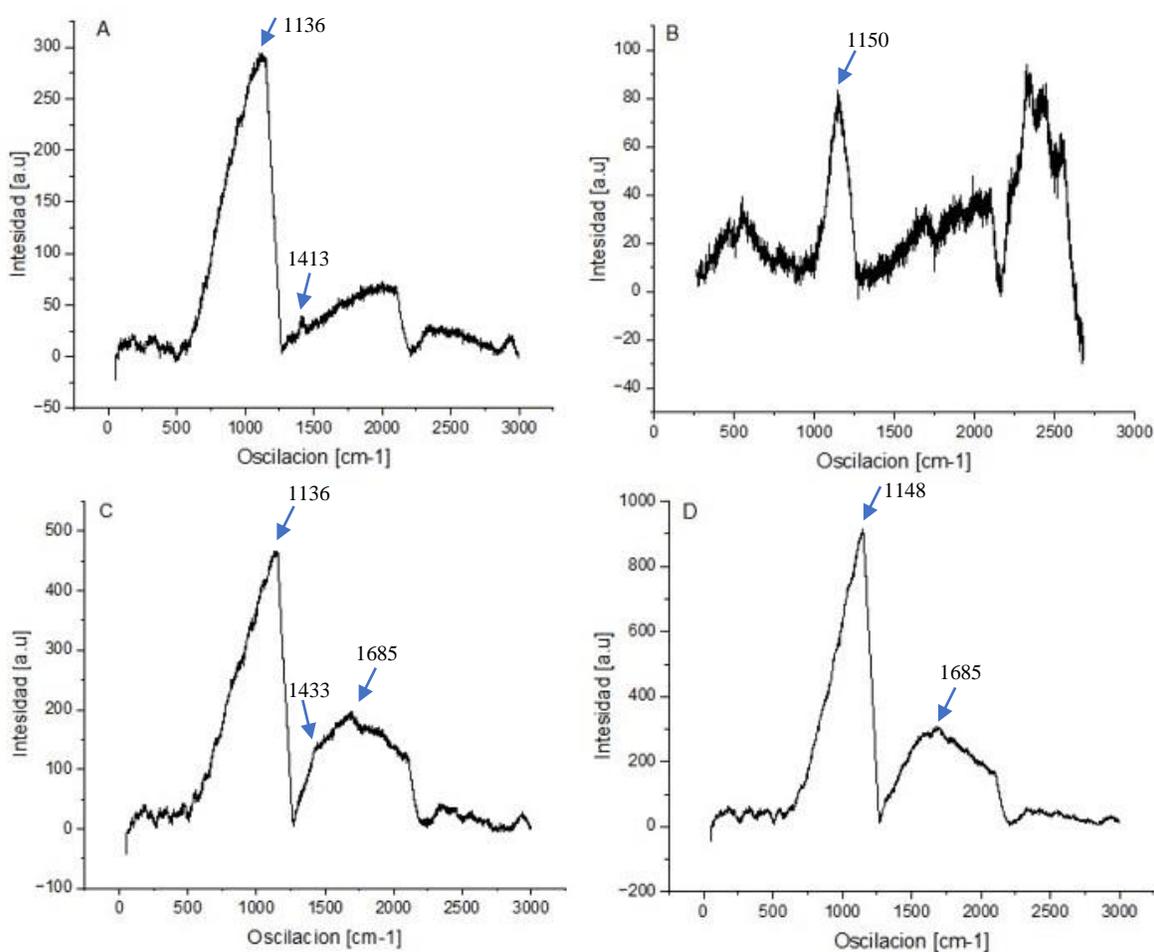


Fig. 17: Espectro Raman de los materiales utilizados. A) Alginato de sodio. B) Nanofibra de celulosa. C) Esfera de alginato. D) Esfera de alginato con 15% nanofibra de celulosa.

Para poder analizar los resultados es necesario comparar los espectros Raman de las esferas con y sin NFC con el espectro típico asociado a los compuestos puros. La estructura

molecular del alginato y de las NFC está compuesta ambas por enlaces C-O, O-H y R-O-R; por lo tanto, hay que centrarse en buscar las bandas asociadas a estos enlaces y comparar su comportamiento en las muestras estudiadas. La tabla 7 muestra las bandas Raman que se pueden asociar a las muestras estudiadas.

Tabla N°7. Bandas Raman típicas encontradas en celulosa, Ref: Agarwal et al., 2010

Tipo de enlace	Banda Raman (cm ⁻¹)
C-O-C	1200-1250, 1050
-CH ₃	1400-1450, 2920
-COO-	1600
C-C	1090, 1420
O-H	3300

Tanto el alginato, las NFC y ambas muestras de esferas de alginato presentan una banda alrededor del 1148 cm⁻¹, la cual es la de mayor intensidad. Esta banda corresponde al enlace C-O-C que está presente tanto en la estructura química del alginato como en la celulosa. Llama la atención que la intensidad de esta banda Raman en la esfera de alginato con NFC es mayor que en los dos compuestos puros, lo que puede sugerir una superposición de estas bandas ya que este enlace se encuentra en todas las muestras.

Ambas muestras de esferas de alginato presentan una banda bastante ancha entre 1500 cm⁻¹ y 2000 cm⁻¹ incluyendo una señal a los 1685 cm⁻¹ que se puede asociar al estiramiento del grupo -COO- carboxilo, Ya que este grupo carboxilo no se encuentra presente en la celulosa.

Según la literatura la interacción del sodio en el alginato de sodio se presenta como una banda a la señal de 1413 cm⁻¹, mientras que, al gelificar con calcio la interacción con esta genera una banda a en 1433 cm⁻¹ (Pielesz et al., 2008), por lo tanto, la pequeña banda de 1418 cm⁻¹ de la Figura 17 A) correspondiente al alginato de sodio puro puede asociarse a esta interacción del ion sodio con el alginato. Aunque la banda Raman correspondiente al ion calcio que debiese estar a los 1433 cm⁻¹ apenas se logra apreciar en la Figura 17 C) de la muestra de alginato, está presente, pero a menor intensidad. Como en la muestra con NFC (Figura 17 D) no se encuentra la banda asociada al ion calcio, se podría dar a entender que un exceso de NFC debilita la interacción del ion Ca²⁺ con el alginato, pues la molécula de celulosa posee menos átomos de oxígeno que la hacen menos electronegativa.

Los espectros Raman obtenidos en este estudio no muestran números de onda mayores a 3000 cm^{-1} lo que impidió revisar las interacciones mayores a 3000 cm^{-1} correspondientes a enlaces O-H.

6 Conclusiones

A través de la metodología empleada, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de NFC en los biomedios y se estudió su estabilidad mecánica tanto en agua destilada como en agua RAS. La incorporación de nanofibras de celulosa en biomedios microalgales de alginato demostró tener un impacto significativo en las propiedades mecánicas y estructurales de los biomedios, que puede ser favorable o desfavorable dependiendo de la concentración de NFC

Las pruebas mecánicas demostraron que las muestras con NFC presentaron una mayor resistencia mecánica en comparación con las que no tenían NFC tanto en agua destilada como en agua RAS, sin embargo, una concentración superior al 15% de NFC tiende a debilitar la estructura de las esferas y la presencia de microalgas no tienen un impacto negativo en la resistencia de los medios de alginato.

Los espectros Raman obtenidos de las muestras con y sin NFC revelaron la presencia del grupo carboxilo característico del alginato. La intensidad de esta banda fue mayor en las muestras de alginato con NFC, revelando mayor presencia de este grupo químico.

7 Referencias

- Abdul Khalil, A. H. P. S., Tye, Y. Y., Saurabh, C. K., Leh, C. P., Lai, T. K., Chong, E. W. N., et al. (2017). *Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material*. *Express Polymer Letters*, 11(4), 244–265.
- Agarwal, U. P., & Ralph, S. A. (1997). *FT-Raman spectroscopy of wood: identifying contributions of lignin and carbohydrate polymers in the spectrum of black spruce (Picea mariana)*. *Applied spectroscopy*, 51(11), 1648-1655
- Cheng, D., Jiang, C., Xu, J., Liu, Z., & Mao, X. (2020). *Characteristics and applications of alginate lyases: A review*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1304-1320.
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1133-1152.
- Chourpa, I., Carpentier, P., Maingault, P., Fetissoff, F., & Dubois, P. (2000, May). Raman probing of molecular interactions of alginate biopolymers with cells. In *Biomedical Spectroscopy: Vibrational Spectroscopy and Other Novel Techniques* (Vol. 3918, pp. 166-173). SPIE.
- Crab, R., Avnimelech, Y., Defoirdt, T., Bossier, P., & Verstraete, W. (2007). *Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production*. *Aquaculture*, 270(1-4), 1-14.
- Das, P. C., Ayyappan, S., Jena, J. K., Singh, S. K., Patamajhi, P., & Muduli, H. K. (2004). *Effect of aeration on production and water quality changes in intensive carp culture*. *Indian Journal of Fisheries*, 51(2), 173-183.
- Emparan, Q., Harun, R., & Danquah, M. K. (2019). *Role of phycoremediation for nutrient removal from wastewaters: A review*. *Applied Ecology & Environmental Research*, 17(1).
- Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Buckner, I. S., Velankar, S., ... & Block, L. H. (2011). *Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties*. *Aaps Pharmscitech*, 12, 453-460.

- Ghazal, F. M., Mahdy, E. S. M., El-Fattah, M. S. A., El-Sadany, A. E. G. Y., Elg, Y., & Doha, N. M. E. (2018). *The use of microalgae in bioremediation of the textile wastewater effluent. Nat. Sci*, 16, 98-104.
- Gutierrez-Wing MT, Malone RF (2006) *Biological filters in aquaculture: trends and research directions for freshwater and marine applications. Aquacultural Engineering* 34: 163–171.
- Hu, C., Lu, W., Mata, A., Nishinari, K., & Fang, Y. (2021). *Ions-induced gelation of alginate: Mechanisms and applications. International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 578-588.
- Isogai, A., Saito, T., & Fukuzumi, H. (2011). *TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. nanoscale*, 3(1), 71-85.
- Julian, T. N., Radebaugh, G. W., & Wisniewski, S. J. (1988). *Permeability characteristics of calcium alginate films. Journal of controlled release*, 7(2), 165-169.
- Li, W., Wu, Q., Zhao, X., Huang, Z., Cao, J., Li, J., & Liu, S. (2014). *Enhanced thermal and mechanical properties of PVA composites formed with filamentous nanocellulose fibrils. Carbohydrate Polymers*, 113, 403-410.
- Lin, Q., Wen, D., & Wang, J. (2010). *Biodegradation of pyridine by Paracoccus sp. KT-5 immobilized on bamboo-based activated carbon. Bioresource Technology*, (2010). 101: 5229-5234.
- McGee, M. V., & Cichra, C. (2000). *Principles of water recirculation and filtration in aquaculture. Gainesville, FL: University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences, EDIS*.
- Milhazes-Cunha, H., & Otero, A. (2017). *Valorisation of aquaculture effluents with microalgae: the integrated multi-trophic aquaculture concept. Algal research*, 24, 416-424.
- Mook, W. T., Chakrabarti, M. H., Aroua, M. K., Khan, G. M. A., Ali, B. S., Islam, M. S., & Hassan, M. A. (2012). *Removal of total ammonia nitrogen (TAN), nitrate and total organic carbon (TOC) from aquaculture wastewater using electrochemical technology: a review. Desalination*, 285, 1-13.
- Nechyporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). *Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. Industrial Crops and Products*, 93, 2-25.

- Pielesz, A., & Bąk, M. K. K. (2008). *Raman spectroscopy and WAXS method as a tool for analysing ion-exchange properties of alginate hydrogels. International journal of biological macromolecules*, 43(5), 438-443.
- Qua, E. H., Hornsby, P. R., Sharma, H. S. S., & Lyons, G. (2011). *Preparation and characterisation of cellulose nanofibres. Journal of Materials Science*, 46, 6029-6045.
- Saba, N., Safwan, A., Sanyang, M. L., Mohammad, F., Pervaiz, M., Jawaid, M., ... & Sain, M. (2017). Thermal and dynamic mechanical properties of cellulose nanofibers reinforced epoxy composites. *International journal of biological macromolecules*, 102, 822-828.
- Sibrell, P. L., Watten, B. J., Haines, T. A., & Spaulding, B. W. (2006). *Limestone fluidized bed treatment of acid-impacted water at the Craig Brook National Fish Hatchery, Maine, USA. Aquacultural engineering*, 34(2), 61-71.
- Taelman, S. E., De Meester, S., Roef, L., Michiels, M., & Dewulf, J. (2013). *The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: a life cycle perspective. Bioresource technology*, 150, 513-522.
- Tom, A. P., Jayakumar, J. S., Biju, M., Somarajan, J., & Ibrahim, M. A. (2021). *Aquaculture wastewater treatment technologies and their sustainability: A review. Energy Nexus*, 4, 100022.
- Voo, W. P., Lee, B. B., Idris, A., Islam, A., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2015). Production of ultra-high concentration calcium alginate beads with prolonged dissolution profile. *RSC Advances*, 5(46), 36687-36695.
- Xiao, J., Zhao, K., Tian, X., Song, Q., Zhang, K., Ma, Y., & Wang, W. (2021). *Impact of calcium-carboxylate interactions in cellulose nanofiber reinforced alginate based film with triple-decker-like structure. LWT*, 151, 112197.
- Zhao, Y., Moser, C., Lindstrom, M., Henriksson, G., & Li, J. (2017b). *Cellulose nanofibers from softwood, hardwood, and tunicate: Preparation-structure-film performance interrelation. ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(15), 13508–13519

8 Anexos

Anexo A: Tabla de mediciones de las muestras.

La tabla N muestra las propiedades medidas de las muestras a distintos tiempos de exposición tanto en agua destinada como en agua RAS. Cada medición en la tabla corresponde a 5 unidades de cada muestra promediadas.

Tabla N°8. propiedades de peso y dimensión de las muestras expuestas en agua destilada y agua RAS durante distintos intervalos de días.

Muestra	Tiempo (días)	Agua Destilada				Agua RAS			
		Peso húmedo (mg)	Peso liofilizado (mg)	Diámetro húmedo (cm)	Diámetro liofilizado (cm)	Peso húmedo (mg)	Peso liofilizado (mg)	Diámetro húmedo (cm)	Diámetro liofilizado (cm)
M1	0	95	8	0,55	0,34	95	8	0,55	0,34
	1	74	4	0,51	0,28	75	3	0,53	0,30
	3	66	3	0,48	0,28	68	4	0,52	0,30
	6	68	4	0,48	0,28	61	4	0,49	0,27
	9	63	4	0,47	0,26	66	4	0,48	0,27
	14	64	4	0,49	0,27	68	4	0,49	0,34
M2	0	80	3	0,51	0,34	80	3	0,51	0,34
	1	68	3	0,48	0,29	68	3	0,52	0,30
	3	64	4	0,47	0,30	59	4	0,46	0,28
	6	54	4	0,45	0,27	59	4	0,45	0,29
	9	56	3	0,46	0,28	62	3	0,46	0,27
	14	57	4	0,47	0,33	61	4	0,47	0,33
M3	0	88	5	0,52	0,33	88	5	0,52	0,33
	1	72	4	0,50	0,29	69	4	0,50	0,30
	3	69	4	0,49	0,28	66	4	0,50	0,31
	6	66	4	0,49	0,29	65	3	0,49	0,35
	9	67	4	0,49	0,33	66	3	0,48	0,39
	14	68	4	0,50	0,33	66	4	0,48	0,37
M4	0	95	13	0,54	0,39	95	13	0,54	0,30
	1	74	4	0,47	0,37	69	4	0,50	0,32
	3	66	4	0,48	0,36	67	3	0,48	0,36
	6	67	3	0,48	0,37	67	3	0,48	0,37
	9	68	4	0,48	0,37	66	3	0,48	0,37
	14	67	4	0,48	0,38	65	4	0,48	0,40

Anexo B: Tabla de mediciones de las muestras gelificadas durante distintos intervalos de tiempo.

La Tabla 9 muestra las propiedades que se midieron de las muestras que se mantuvieron durante 1 hora, 4 horas y 24 horas en solución de cloruro de calcio en distintos intervalos de días.

Tabla N°9. propiedades de peso y diámetro de las muestras gelificadas a 1, 4 y 24 horas expuestas al agua RAS durante distintos intervalos de días.

Muestra	Tiempo (días)	Peso húmedo (mg)	Peso liofilizado (mg)	Diámetro húmedo (cm)	Diámetro liofilizado (cm)
M3-1H	0	58	6	0,46	0,29
	7	35	2	0,40	0,28
	14	36	2	0,40	0,28
M3-4H	0	56	4	0,46	0,30
	7	38	2	0,41	0,30
	14	39	2	0,41	0,29
M3-24H	0	57	7	0,46	0,29
	7	36	2	0,41	0,30
	14	34	2	0,40	0,30

Anexo C: Tabla de mediciones de las muestras con mayor concentración de microalgas

La Tabla 10 muestra los pesos y diámetros medidos a las muestras con alta concentración de microalga, en estado húmedo como liofilizadas.

Tabla N°10. propiedades de peso y diámetro de las muestras gelificadas a 1, 4 y 24 horas expuestas al agua RAS durante distintos intervalos de días.

Muestra	Tiempo (días)	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	Diámetro húmedo (cm)	Diámetro seco (cm)
M1-2	0	59	9	0,46	0,32
	7	35	2	0,40	0,29
	14	34	2	0,39	0,29
M2-2	0	63	10	0,46	0,32
	7	37	2	0,41	0,29
	14	35	2	0,40	0,28
M3-2	0	59	6	0,46	0,33
	7	38	2	0,41	0,29
	14	35	2	0,41	0,29
M4-2	0	61	7	0,46	0,33
	7	38	2	0,41	0,30
	14	38	2	0,41	0,29

Anexo D: Degradación del diámetro en los biomedio de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada.

Para la degradación del diámetro en agua destilada mostrada en la Figura 18 se observa una fuerte disminución de su diámetro durante el primer día del experimento, continuando levemente hasta el día 3, momento en el cual el diámetro de las esferas de alginato se mantienen relativamente constantes hasta el día 14. Esto se correlaciona con la Figura 11 en la cual sucede lo mismo con el peso. La muestra que menor pérdida de longitud fue la M3 con una disminución del $5 \pm 2\%$, seguido por la muestra M2 con una pérdida del $8 \pm 3\%$, mientras que la muestra M4 y M1 perdieron el $10 \pm 1 \%$ y $11 \pm 1 \%$ de su diámetro.

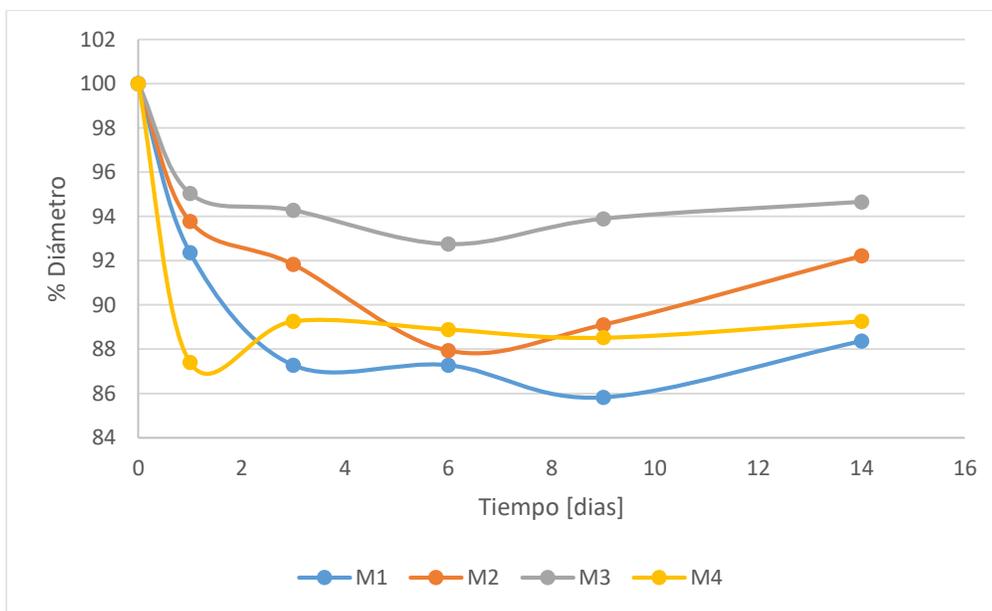


Fig. 18: Cambio del diámetro de los medios de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua destilada durante 14 días. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC, M4:15% NFC.

La degradación con respecto al diámetro de los biomedios en agua RAS (Figura 19) también se evidencia una disminución durante los primeros 3 días, a excepción de la muestra M1 y M3 la cuales fueron más suave. Las muestras M1, M2 y M3 tuvieron una disminución del $9 \pm 1 \%$ y la muestra M4 tuvo una disminución del $13 \pm 1 \%$.

La muestra que conservo más diámetro para el día 14 fue la muestra M1 con una masa de 0,49 cm mientras que la muestra M4 tiene un peso de 0,48 cm y la muestra M3 tiene un peso de 0,47 cm y finalmente la muestra M2 tiene una masa de 0,46 cm.

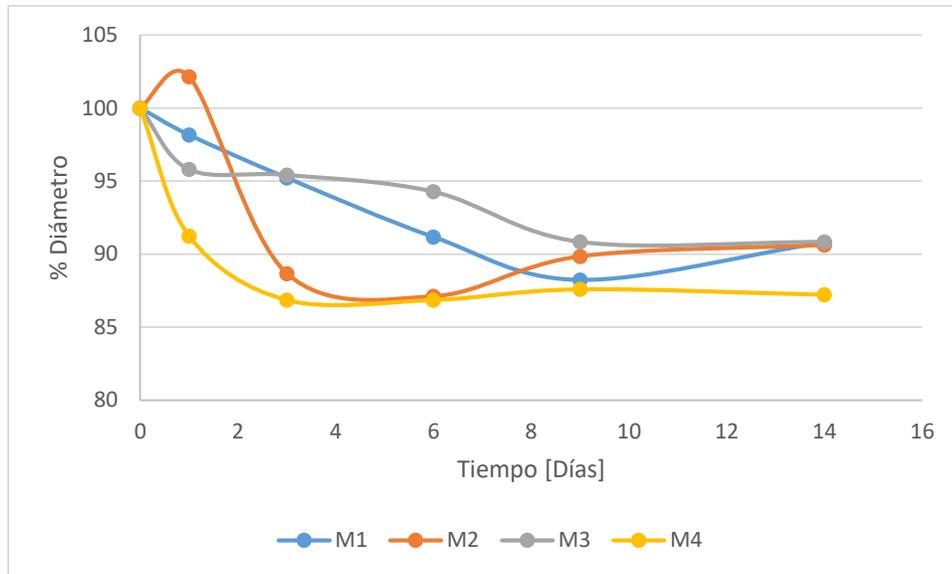


Fig. 19: Cambio del diámetro de los medios de alginato a distintas concentraciones de NFC en agua RAS durante 14 días. M1: sin NFC, M2: 5% NFC, M3:10% NFC, M4:15% NFC.

Anexo E: Fuerza estándar aplicada a cada muestra durante la prueba de compresión

La figura 20 y 21 muestra las fuerzas de compresión a cada una de las muestras liofilizadas durante la prueba de compresión. Cada muestra se repitió la prueba cinco veces.

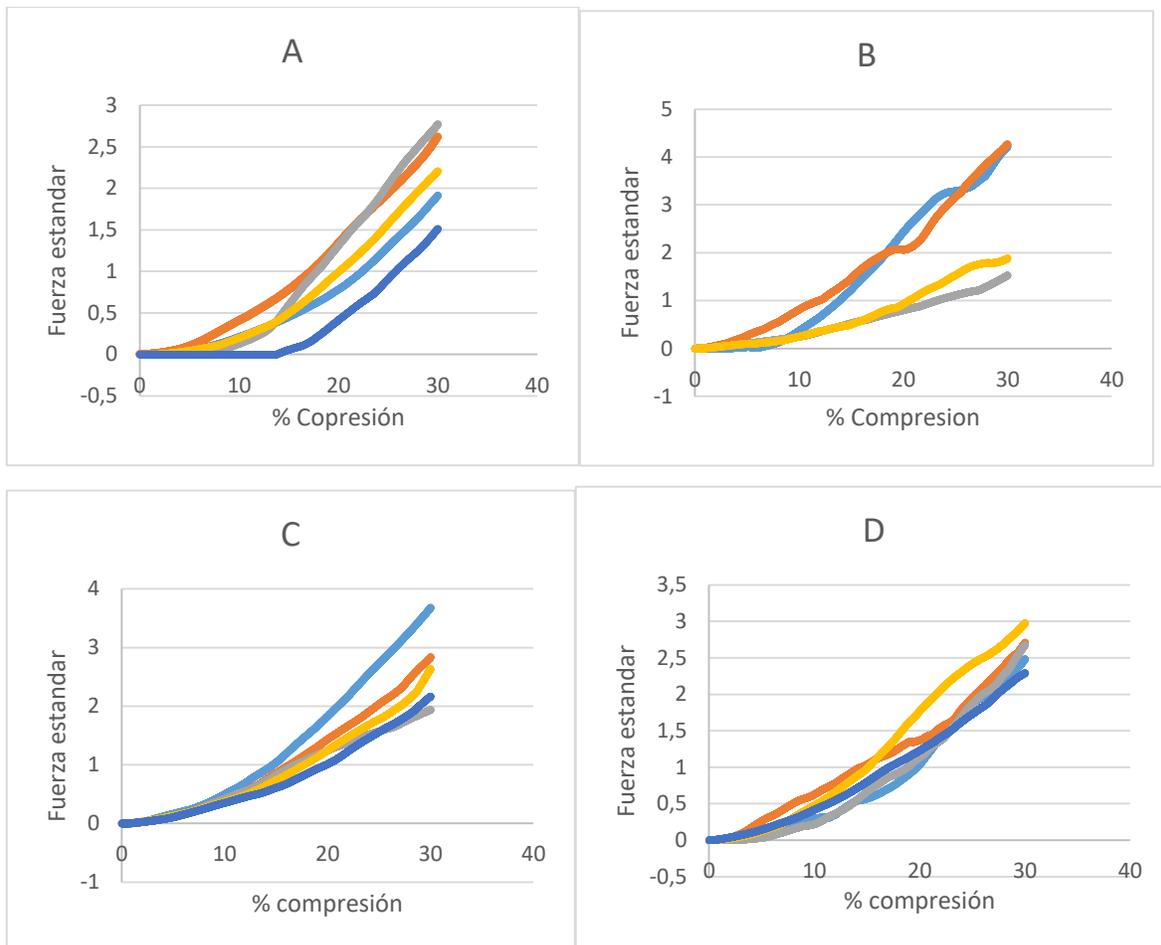


Fig. 20: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 5 muestras medidas que estuvieron en agua destilada. A) M1: sin NFC, B) M2: 5% NFC, C) M3: 10% NFC, D) M4: 15% NFC.

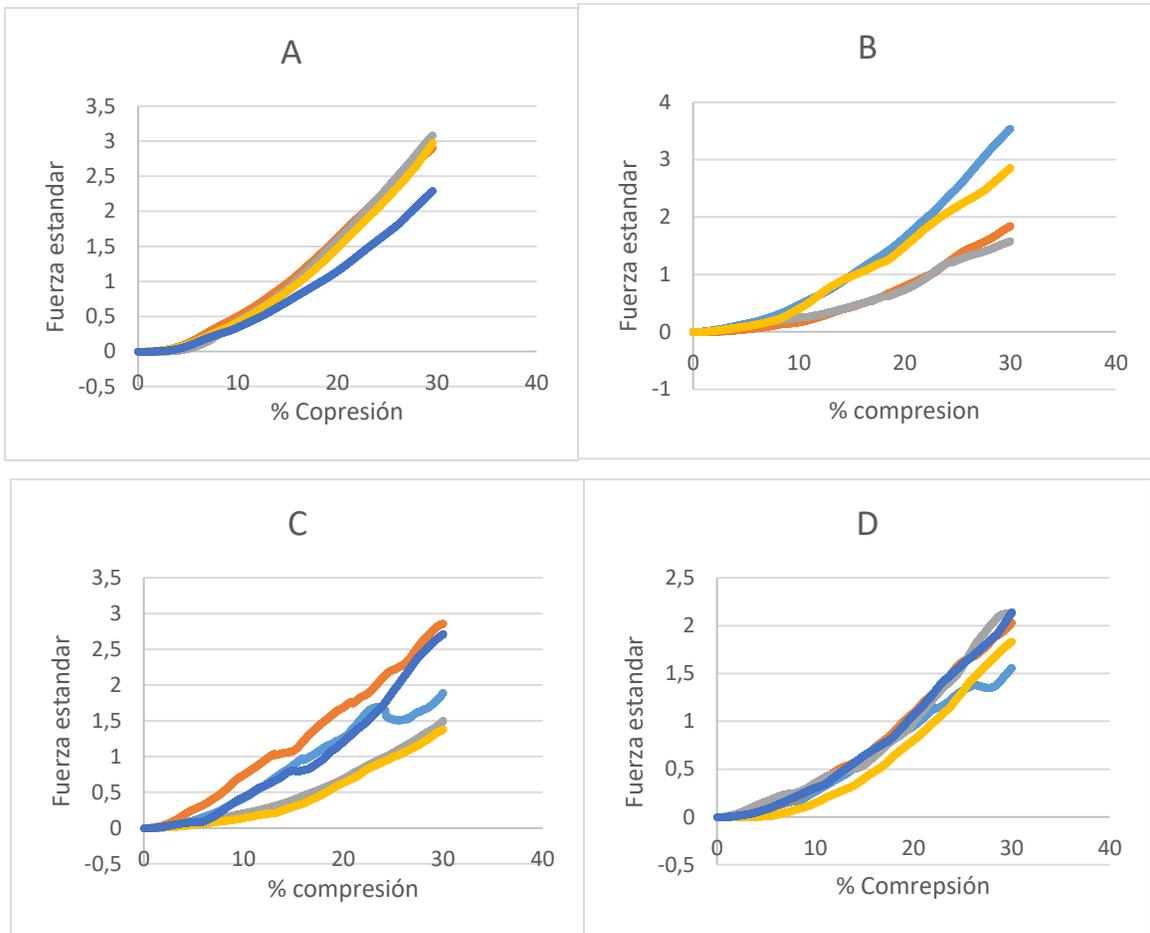


Fig. 21: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 5 muestras medidas que estuvieron en agua RAS. A) M1: sin NFC, B) M2: 5% NFC, C) M3: 10% NFC, D) M4: 15% NFC.

Anexo F: Fuerza estándar a cada una de los quintuplicados de las muestras con alta concentración de microalga.

La figura 20 muestra las fuerzas de compresión a cada una de las muestras con mayor y menor concentración de microalga. Cada muestra se repitió la prueba cinco veces.

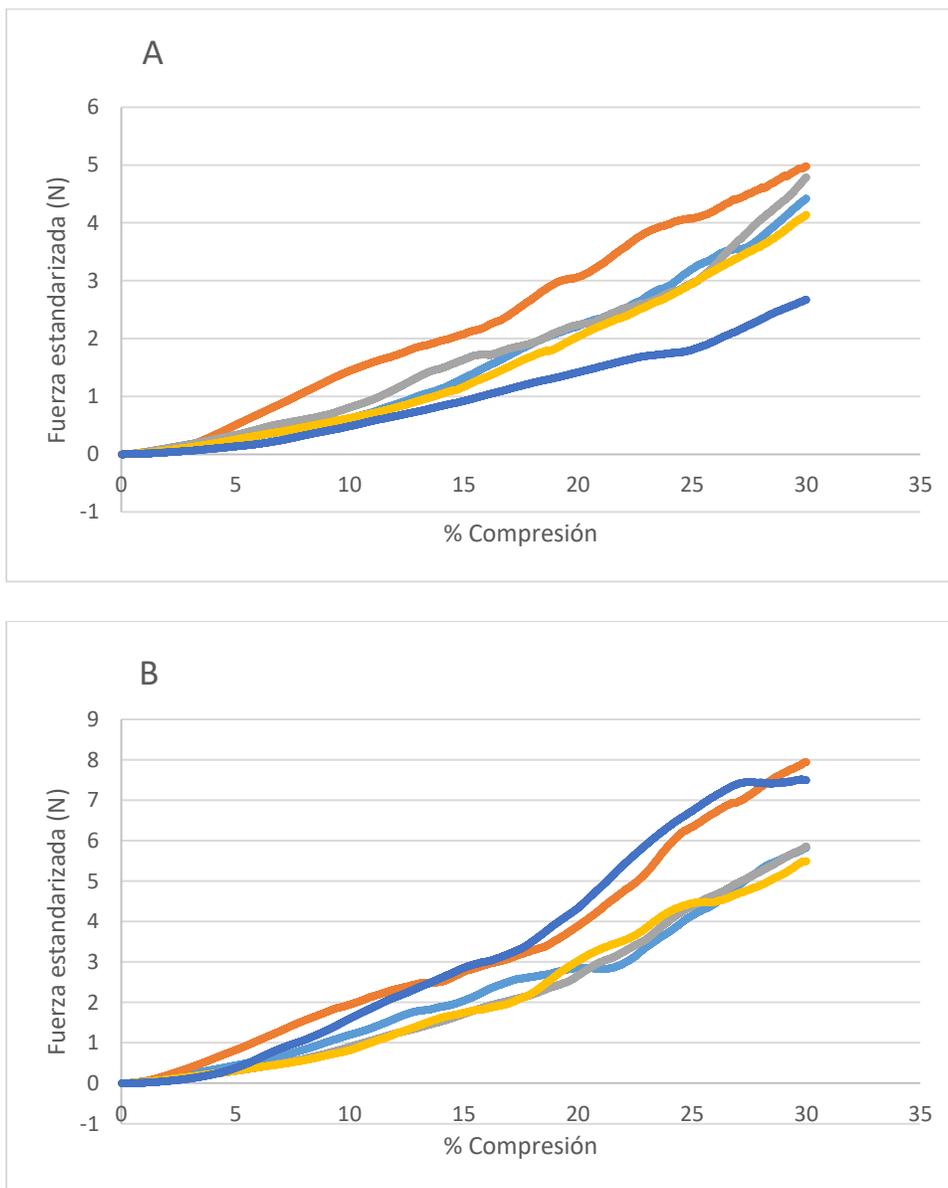


Fig. 22: Variación de la fuerza aplicada vs porcentaje de compresión para los quintuplicados de las 4 muestras con alta concentración de microalgas medidas que estuvieron en agua RAS. A) M3-2: 10% NFC con baja concentración de microalga B) M3-2: 10% NFC con alta concentración de microalga.