

## Aislamiento de nanocelulosa 2D a partir de la pared celular de *Sargassum* spp

J. Silva-Mendoza<sup>1</sup>, A. Toxqui-Terán<sup>2</sup>, L. E. Elizalde-Herrera<sup>3</sup>, O. Pérez-Camacho<sup>3</sup>, L. Chávez-Guerrero<sup>4\*</sup>,

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Químicas. Ave. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455. México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación en Materiales Avanzados S. C. (Unidad Monterrey), Av. Alianza Norte 202, Parque PIIT, Apodaca CP 66628, Nuevo León, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Química Aplicada. Blvd. Enrique Reyna Hermosillo No. 140, Saltillo, Coahuila, C.P. 25294. México.

<sup>4</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica. Ave. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolas de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455. México.

\*e-mail: leonardo.chavezgr@uanl.edu.mx

Recibido 30 octubre 2022, Aceptado 30 noviembre 2022

### Resumen

La nanocelulosa se ha convertido en un biopolímero importante para la obtención de empaques, fibra dietética y aditivos alimentarios, entre otros productos. En este trabajo, la nanocelulosa fue aislada a partir de sargazo a través de un proceso innovador de pasos sucesivos en un solo recipiente. El material obtenido fue caracterizado por FTIR, RMN, espectrofotometría UV-Vis, microscopía de barrido láser y microscopía electrónica de barrido demostrando la presencia de nanoláminas de celulosa compuestas de nanofibras de celulosa con un espesor de  $\approx 100$  nm. Finalmente, se preparó un film transparente el cual presentó una transmitancia del 81%.

### Abstract:

Nanocellulose has become an important biopolymer for obtaining packaging, dietary fiber and food additives, among other products. In this work, nanocellulose was isolated from sargassum through an innovative process of successive steps in a one-pot. The material obtained was characterized by FTIR, NMR, UV-Vis spectrophotometry, laser scanning microscopy and scanning electron microscopy, demonstrating the presence of cellulose nanosheets composed of cellulose nanofibers with a thickness of  $\approx 100$  nm. Finally, a transparent film was prepared which presented a transmittance of 81%. Palabras clave: Alga parda; nanocelulosa bidimensional (2D); gestión de residuos; nanoláminas de celulosa; Sargazo.

Keywords: Brown algae; two-dimensional (2D) nanocellulose; waste management; cellulose nanoplatelets; Sargasso.

## 1. Introducción

El sargazo es un alga parda invasora que recientemente ha sido considerada un problema en algunos países, debido a su llegada masiva a las costas del Caribe, afectando la industria del turismo y perturbando el hábitat de varios organismos acuáticos. En 2014, el sargazo alcanzó una concentración 300 veces mayor de la reportada en los últimos 20 años (Schell et al. 2015). Mientras que en 2018 se registraron alrededor de 20 millones de toneladas métricas en el Mar de los Sargazos, y según Wang et al. (2019) esto podría ocurrir cada año, como consecuencia del enriquecimiento de nutrientes provenientes de África occidental y del río Amazonas (Wang et al. 2019). Sin embargo, se ha sugerido que el Mar de los Sargazos no tiene influencia en la llegada masiva de sargazo al Caribe (Schell et al. 2015), sino que es más probable un crecimiento acelerado del sargazo debido a los nutrientes del río Amazonas.

Se sabe que las especies de sargazo contienen una amplia variedad de metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones en industrias como biocombustibles, nutracéuticos, farmacéutica, cosmética, entre otras (Lee et al. 2022). Remover el sargazo que llega a las playas resulta costoso para las ciudades y países, por tanto, representa un área de oportunidad el investigar y desarrollar procesos para convertir el sargazo recuperado en productos de alto valor.

Las algas pardas tienen varios polisacáridos en su estructura celular; uno de los más importantes en la industria es un polisacárido lineal, la celulosa (Sterner M y Edlund 2016), que se utiliza como aditivo alimentario (Ren et al. 2020), fibra dietética (Brownlee et al. 2017), o materiales de base biológica para empaques (Devault et al. 2020, Doh et al. 2020). La celulosa es convertida a nanocelulosa y se emplea comúnmente en forma de películas delgadas para la elaboración de empaques, compósitos, películas antimicrobianas, entre otros (Abdul et al. 2017; Doh et al. 2020).

Se han empleado varios métodos para la obtención de nanocelulosa, como síntesis bacteriana, hidrólisis química, molienda mecánica, hidrólisis enzimática o una combinación de ellas. Existen 3 principales tipos de nanocelulosa: 1D que son nanocristales (Mohamad et al. 2013), nano fibras (Zhang et al. 2018), y nanocelulosa bacteriana (Núñez-Carmona et al. 2019). Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de nanocelulosa del tipo 2D (escamas, láminas o plaquetas) (Chávez-Guerrero et al. 2021). Una característica común de todos los tipos de nanocelulosa es tener una de sus dimensiones menor a 100 nm (nanoescala), que puede ser el diámetro, la longitud o el espesor de la nanoestructura.

La madera es la principal fuente de celulosa utilizada por la industria, sin embargo, los procesos de extracción son altamente contaminantes debido a la

cantidad y variedad de reactivos requeridos. Además, la madera requiere de pretratamientos, tales como molienda (madera dura), blanqueo y alcalinización, y finalmente, pasos posteriores de hidrólisis y purificación para obtener la pasta final. Por tal motivo, se requieren otras fuentes de biomasa celulósica; especialmente si son subproductos o contaminantes en sí mismos (Chávez-Guerrero et al. 2019, Mouritsen et al. 2020), como algunas algas pardas (*Sargassum spp.*), facilitando la gestión de residuos evitando una mayor contaminación de la playa y los vertederos (Mouritsen et al. 2020). La cantidad de lignina en las algas pardas es menor en comparación con las plantas terrestres (Wargacki et al. 2012) debido a la falta de rigidez requerida en el agua, además, el costo de cultivo y cosecha es insignificante debido a que *Sargassum spp.* es un producto no deseado que debe ser retirado de las costas o, si es posible, capturado en mar abierto, lo que resuelve el problema de los requerimientos de agua salada en grandes extensiones terrestres. Debido a las llegadas masivas de sargazo pelágico a las costas del Caribe Mexicano (y otros países) cada año, es necesario desarrollar un proceso rápido y amigable con el ambiente (Chávez-Guerrero et al. 2019, Chávez-Guerrero et al. 2021) para gestionar esta alga parda que afecta negativamente a esas regiones; de manera ecológica (mal olor, agotamiento de oxígeno y biomasa en descomposición) y económica (erosión de playas, reducción del turismo y costo de extracción de biomasa) (Chávez et al. 2020).

En este trabajo se presenta la síntesis de películas de celulosa transparente utilizando *Sargassum spp.*, implementando un proceso innovador que ocurre en 3 etapas sucesivas llevadas a cabo en el mismo recipiente (one-pot) para aislar nanocelulosa 2D, evitando largos pretratamientos o uso excesivo de recursos para lavar y neutralizar el material entre pasos, proponiendo una forma ecológica de solucionar el problema de los desembarcos masivos anuales de esta alga parda en las costas del Caribe.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

El hidróxido de sodio (pellets), el peróxido de hidrógeno (30%) y el ácido sulfúrico concentrado (98%) fueron grado reactivo y se usaron tal como se recibieron. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada, con una resistividad de 18 M $\Omega$ -cm<sup>-1</sup>

### 2.2 Pretratamiento

El sargazo se recolectó de la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Se realizó un pretratamiento del sargazo con la finalidad de acondicionar el material, eliminar contaminantes y homogeneizar la muestra, para tal fin el sargazo fue lavado, secado y molido. Primeramente, en un vaso de precipitados se mezclaron el sargazo y agua en una relación 1:10. La mezcla se calentó a 60 °C por 1 h y posteriormente el sargazo se lavó 3 veces con agua desionizada a 25°C. Para eliminar el agua, el sargazo se

mantuvo en una estufa a 40 °C por 48 h. Finalmente se molió y tamizó (malla #50) para obtener un polvo del sargazo, el cual fue nombrado Control.

### 2.3 Aislamiento de nanocelulosa

Paso 1: Para el aislamiento de la nanocelulosa, se agregaron 5 g de polvo de sargazo en un frasco esterilizable de vidrio con tapón de rosca con 100 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), calentado previamente a 70 °C, estas condiciones fueron mantenidas por 60 min, esta muestra se denominó Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Paso 2: Posteriormente, se adicionaron 50 mL de una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) en una relación 1:16, se mantuvo durante 60 min a 70 °C, esta muestra se nombró Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Paso 3: La mezcla Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se calentó en autoclave por 60 min a 110 °C y 0.5 Psi. Finalmente, se apagó la autoclave y se extrajo la botella de vidrio una vez que la temperatura descendió a 70 °C.

La muestra se filtró al vacío y luego se añadieron 100 mL de agua al sólido restante y se neutralizó con NaOH. Finalmente, la muestra se filtró una vez más y el gel residual (nombrado Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ácido) se depositó en un recipiente y se dejó secar a temperatura ambiente para obtener una película delgada. Todas las muestras se obtuvieron por triplicado y los resultados se muestran como un promedio.

### 2.3 Análisis termogravimétrico (ATG)

Las propiedades térmicas de las tres muestras se estudiaron utilizando un Thermogravimetric analyzer SDT Q600 TA Instruments. Una bandeja de aluminio con 10 g de la muestra se expuso a una atmósfera de aire en un rango de temperatura de 25 °C a 900 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

### 2.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras se analizaron utilizando un espectrofotómetro Thermo Nicolet 6700 FTIR equipado con el accesorio de reflectancia total atenuada (ATR). La muestra seca se colocó sobre un cristal de diamante y los espectros se obtuvieron en un rango de longitud de onda de 4000-400 cm<sup>-1</sup>, con una resolución espectral de 4 cm<sup>-1</sup>.

### 2.5 Espectrofotometría ultravioleta y visible (UV-Vis)

La transmitancia se obtuvo con un espectrofotómetro Agilent Cary 5000 UV-Vis-NIR equipado con una esfera integradora utilizando el puerto de transmisión y el aire como referencia. También se analizó un portaobjetos como referencia.

### 2.6 Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Se depositó una gota de la suspensión de nanocelulosa (Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ácido) sobre una oblea de silicio y luego se secó a 40 °C durante 5 h. Posteriormente, la muestra se recubrió con oro en un Cressington Coater 108 Auto, durante 10 s usando 40 A en atmósfera de argón. La morfología se estudió con un FEI NOVA NANOSEM 200 con tensión de aceleración de 15 kV y distancia de trabajo de 5 mm.

### 2.7 Microscopio de barrido láser (MBL)

Se depositó una gota de la suspensión de nanocelulosa (Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ácido) sobre una oblea de silicio y luego se secó a 40 °C durante 5 h. Se utilizó un microscopio de barrido láser (Confocal) para obtener perfiles de altura con un ZEISS LSM 700, con el fin de estudiar la topografía de las muestras con un láser emisor a 405 nm, utilizando 150 capas y 512 x 512 píxeles para construir cada imagen. Todas las imágenes fueron adquiridas con los objetivos 20X y 100X.

### 2.8 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La caracterización CP/MAS 13C RMN se realizó a 23 °C en un espectrómetro Bruker 500MHz modelo Avance III equipado con una sonda sólida que opera en el ángulo mágico y utiliza rotores de zirconia de 4 mm equipados con turbinas Kel-F con un retardo de relajación de D1 = 4 ms, y tiempo de contacto de 2,82 ms. La muestra de celulosa se empaquetó en los rotores y se hizo girar a 10 KHz. Los experimentos de polarización cruzada de 13C se adquirieron a 125,55 MHz y los espectros se referenciaron externamente al estándar de adamantano (δ38,5 ppm). Las condiciones de optimización de Hartmann-Hahn se lograron ajustando los tiempos de contacto a la potencia de CP en 85 vatios para el canal de carbono. El índice de cristalinidad (CrI) se determinó utilizando la región C4 del espectro (Park, et al. 2010), brevemente; el CrI se calculó utilizando la relación entre el área de la región cristalina (87-92 ppm) y el área total (80-92 ppm). Las curvas de deconvolución se obtuvieron utilizando el programa Origin.

## 3. Resultados

### 3.1 Aislamiento de nanoláminas de celulosa

Es bien sabido que las algas pardas tienen varios compuestos como fucooidanos, alginatos, celulosa, proteínas, etc. (Mouritsen et al. 2020, Abdul Khalil et al. 2017, Devault et al. 2020), por lo que, cuando se lavó el material con agua caliente pudimos extraer algunos de ellos, evitando un mayor contacto de estos con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favoreciendo el aislamiento de la celulosa. Al evaluar el cambio de color de la muestra durante la reacción con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Figura 1a y b), se puede suponer que una hora es suficiente para blanquear parcialmente la muestra, lo que implica que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> llega al interior de la biomasa debido al proceso de molienda durante el pretratamiento. Por otro lado, el tratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ayuda a disolver el

alginato y otros compuestos celulares, y finalmente se rompe la estructura natural y se libera por completo todos los compuestos no celulósicos en la solución que se pueden eliminar fácilmente mediante filtración junto con todos los residuos de reacción, este efecto se puede apreciar en las Figuras 1a y c.

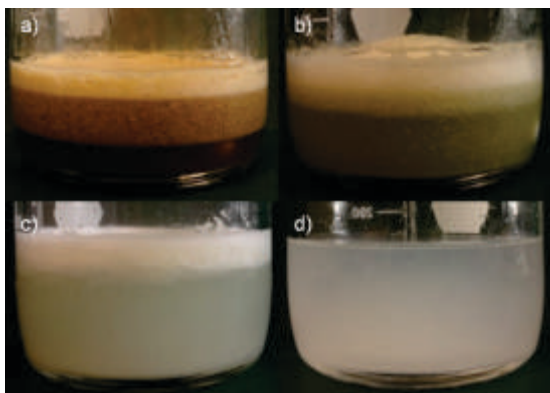


Figura 1. Proceso de obtención de nanocelulosa. Se observa la apariencia del sargazo en cada etapa del proceso. Sargazo al momento de disolver en  $H_2O_2$  (a), después de una hora en esas condiciones (b). Posteriormente se observa el efecto del  $H_2SO_4$  a  $70\text{ }^\circ\text{C}$  (c) y  $110\text{ }^\circ\text{C}$  (d).

### 3.2 Análisis termogravimétrico

Los resultados de ATG muestran la presencia de fucoidanos, celulosa, proteínas y alginatos, como se informó anteriormente (Anastasakis et al. 2011), que aún están presentes después del lavado con agua caliente (Control), lo que implica que se requiere un pretratamiento más agresivo. Como era de esperar, la muestra Control presenta una mayor cantidad de agua libre (6.8%), en comparación con las otras muestras, debido principalmente a la gran variedad de compuestos, orgánicos e inorgánicos, presentes en la materia prima (Figura 2). En el rango de  $80\text{ }^\circ\text{C}$  a  $220\text{ }^\circ\text{C}$ , todas las muestras muestran una pequeña pérdida, que puede deberse a la presencia de compuestos volátiles y agua unida a las fibras del material (Cui et al. 2020). En cuanto a las muestras Control y Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se pueden observar tres pendientes en el rango de  $220\text{ }^\circ\text{C}$  –  $390\text{ }^\circ\text{C}$ , que pueden corresponder a la descomposición inicial del alginato y la celulosa (Li et al. 2020), mientras que solo se puede detectar celulosa en el caso del Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ácido. En todos los casos, la mayor pérdida se presenta en la región entre  $220\text{ }^\circ\text{C}$  a  $390\text{ }^\circ\text{C}$ , lo que puede atribuirse a la descomposición inicial de los polisacáridos presentes (Kim et al. 2013). En el rango de temperatura entre  $390\text{ }^\circ\text{C}$  –  $560\text{ }^\circ\text{C}$ , se observa un segundo paso de descomposición, que corresponde a la degradación de los productos generados en la primera descomposición, como furfural, furano, ácido acético y compuestos fenólicos (Li et al. 2020). La presencia de fucoidanos se puede detectar a alta temperatura, por encima de  $560\text{ }^\circ\text{C}$  y hasta  $730\text{ }^\circ\text{C}$ , como se demostró anteriormente (Anastasakis et al. 2011).

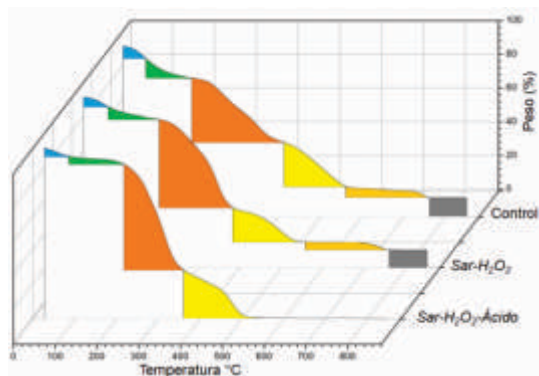


Figura 2. Respuesta térmica de todas las muestras estudiadas en aire, indicando la dependencia de la pérdida de peso (%) con la temperatura.

### 3.3 Análisis FTIR

En la Figura 3, el espectro de transmitancia de una película de nanocelulosa muestra una banda fuerte correspondiente a la vibración de estiramiento de OH y N-H (proteína) que se puede encontrar entre  $3338\text{ } - 3282\text{ } \text{cm}^{-1}$ , mientras que las bandas en  $2852\text{ } \text{cm}^{-1}$  y  $2922\text{ } \text{cm}^{-1}$  están asociadas con la vibración de estiramiento C-H de los grupos metilo y metileno (Cui et al. 2014). Las bandas de  $1722\text{ } \text{cm}^{-1}$  y  $1625\text{ } \text{cm}^{-1}$  pertenecen a los grupos carboxilatos debido al C=O y N-H de las proteínas, respectivamente (Vazquez et al. 2019). Las bandas ubicadas en  $1053\text{ } \text{cm}^{-1}$  y  $1160\text{ } \text{cm}^{-1}$  están relacionadas con el modo de estiramiento y flexión asimétrico C-O-C. La banda de  $898\text{ } \text{cm}^{-1}$  está asociada con el enlace  $\beta$ -glucosídico y la de  $663\text{ } \text{cm}^{-1}$  corresponde a la flexión fuera del plano O-H.

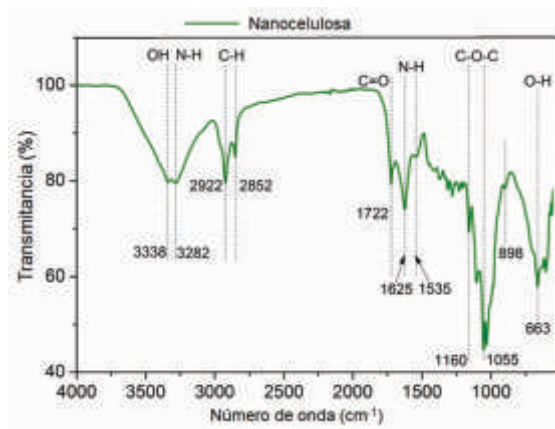


Figura 3. Espectro de transmitancia de una película de nanocelulosa por FT-IR.

### 3.4 Transmitancia UV-Vis

En la actualidad, la contaminación de la tierra y el mar por plásticos ha ido en constante aumento, principalmente por el consumo de botellas y bolsas plásticas y películas utilizadas en los envases, donde algunas de ellas son transparentes para mostrar el producto al consumidor final. La transmitancia de la película de nanocelulosa obtenida estuvo alrededor del 81% en el rango del visible ( $600 \text{ nm}^{-1}$ ), lo que puede considerarse altamente transparente (Figura 4); esta propiedad puede ser una ventaja si el polímero se utiliza como aditivo en la producción de bolsas de plástico transparentes y/o películas de empaque.

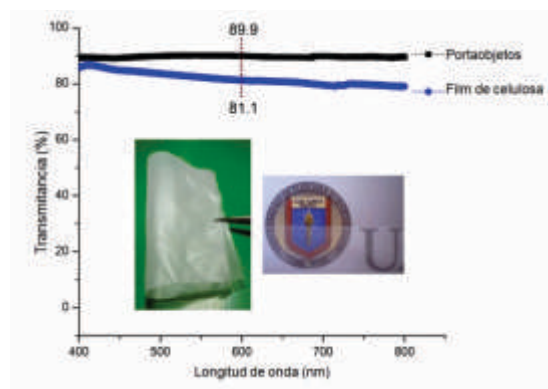


Figura 4. La transmitancia de una película de nanocelulosa aislada de *Sargassum spp.* en comparación con un portaobjetos de vidrio. Se muestran imágenes del film formado.

### 3.5 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los resultados de RMN para la nanocelulosa se pueden ver en la Figura 5, donde el pico de 31 ppm se puede relacionar con las proteínas presentes en el sargazo (Arnold et al. 2015). Así mismo, la región del carbohidrato (celulosa) puede situarse entre 60 – 110 ppm y finalmente la región amida y carbonilo alrededor de 160 – 180 ppm (Arnold et al. 2015), que no están presentes tras la hidrólisis. Se pueden observar los picos característicos de la celulosa (C1 – C6), donde habitualmente se encuentra C1 a 106.2 ppm, luego el doble pico de C4 a 89 ppm (cristalino) y 85 ppm (amorfo), seguido de los picos C2, C3 y C5 situados entre 72 – 75 ppm. Finalmente, el pico de C6 se puede ubicar en torno a las 64 ppm (doble pico).

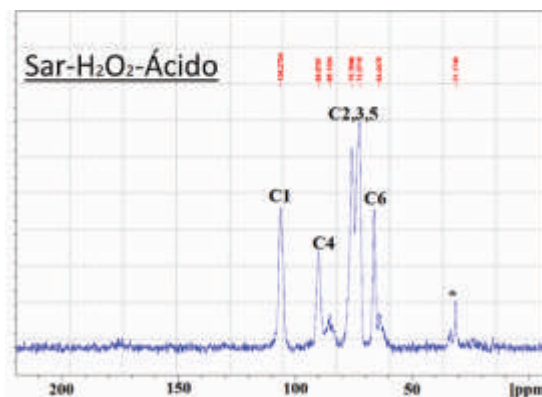


Figura 5. Resultados de RMN de una película de nanocelulosa aislada de *Sargassum spp.*

### 3.6 Análisis morfológico (MEB y MBR)

Como se puede observar en la Figura 6a, la nanocelulosa en forma de láminas o escamas está conformada por nanofibras de celulosa entrelazadas (Figura 6b) con un diámetro promedio de 15 nm (Figura 6c), las cuales pueden considerarse un nuevo tipo de nanocelulosa, junto con los nanocristales de celulosa, las nanofibras de celulosa y la nanocelulosa bacteriana que ya han sido completamente estudiados. La longitud de las nanoláminas de celulosa (NLC) es muy variable, desde unas pocas micras hasta  $100 \mu\text{m}$ , lo que puede dar una relación de aspecto (longitud/grosor) bastante alta, de hasta 1000 nm, como se informó anteriormente en una nanocelulosa extraída de *Agave salmiana* (Chávez-Guerrero et al. 2021).

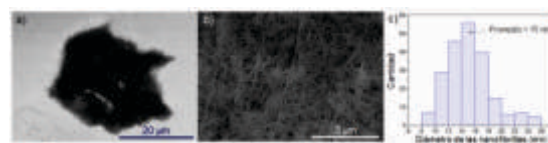


Figura 6. Imagen de microscopio electrónico de barrido de una sola nanolámina de celulosa en (a) y una vista más cercana de las nanofibrillas dentro de la nanoestructura en (b). Diámetro promedio de las nanofibrillas entrelazadas en (c).

En el caso específico de la NLC representada en la Figura 7a, la relación de aspecto es de aproximadamente 320 (longitud  $\approx 32 \mu\text{m}$  y grosor  $\approx 0.1 \mu\text{m}$ ), lo que puede considerarse alto, en comparación con otros tipos de nanocelulosa. Usando la MBL, se puede medir el grosor de la NLC (Figura 7c), donde se puede calcular fácilmente la relación de aspecto. La combinación de técnicas como MBL y microscopía óptica (MO) tiene una gran ventaja ya que el microscopio óptico nos permite encontrar fácilmente la NLC en el sustrato, mientras que con la MBL se mide con precisión las nanopartículas, lo cual es muy difícil usando otras técnicas de caracterización (MEB y microscopio de fuerza atómica).

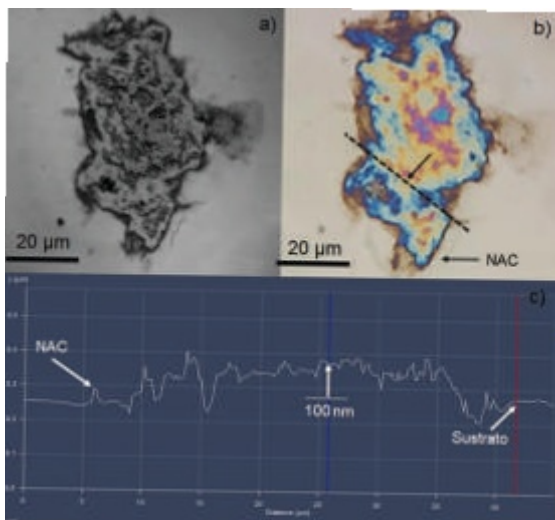


Figura 7. La misma nanolamina de celulosa observada por MBL en (a) y microscopio óptico en (b). Un perfil de altura obtenido por MBL en (c) a partir de la línea punteada representada en la NLC que se muestra en (b).

## Discusión

Informes recientes indican que la extracción de nanocristales de celulosa de algas pardas fue posible a través de varios pasos de blanqueo y alcalinización, seguidos de una hidrólisis con ácidos concentrados ( $H_2SO_4$  o  $HCl$ ) o 2,2,6,6-Tetrametilpiperidina 1-oxilo (TEMPO) (Gao et al. 2018) y finalmente ultrasonificación (Doh et al. al. 2020). La eficiencia de extracción de nanocelulosa en el presente estudio fue de alrededor de 14.9%, lo que se debe principalmente a la falta de pretratamiento, además, todos los componentes no celulósicos se incluyeron en la medición final, por lo que trabajos similares donde se utiliza celulosa aislada de *Sargassum natans*. presentan valores más altos, como el reportado por Doh et al. (2020) con un 42,7% de nanocristales de celulosa. Además, otros estudios que utilizaron algas pardas (Gao et al. 2018) para extraer nanocelulosa encontraron un rendimiento similar, alrededor del 15,2%, lo que concuerda con nuestros resultados. Más importante aún, el presente método de un solo recipiente “one pot” es capaz de extraer nanocelulosa, en forma de plaquetas (NLC) o láminas, evitando el proceso habitual de varios pasos que implica la neutralización y el lavado con el consumo concomitante de agua, recursos y tiempo. Las NLC aisladas de agave, plátano, sargazo, etc. tienen propiedades notables, tales como: permitir la medición del espesor por un microscopio óptico simple, baja cristalinidad y son capaces de formar películas transparentes (Chávez-Guerrero et al. 2021).

En la Figura 2 se puede observar la presencia de compuestos no celulósicos en pequeñas cantidades tras el tratamiento anterior, como 6.5% y 4.7% para Control y Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. El fucoidano y el alginato son

los principales responsables de la ceniza residual, alrededor del 9 – 10% porque absorben metales disueltos en el agua, cuya concentración y disponibilidad dependen de la geografía y la estación (Devault et al. 2020). La ausencia de estos compuestos y cenizas en Sar-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ácido puede ser un indicador indirecto de una correcta extracción, teniendo exclusivamente celulosa (y pequeñas cantidades de proteína) para demostrar que se lleva a cabo la purificación.

Los resultados de FT-IR indican un aislamiento de nanocelulosa adecuado, que se puede realizar en un solo recipiente, utilizando una cantidad baja de agua y reactivos, lo que demuestra la importancia de este proceso innovador. Chávez-Guerrero et al. (2021) obtuvieron resultados similares utilizando el parénquima de *Agave salmiana* o pseudotallos de banano (Chávez-Guerrero et al. 2019) para producir películas transparentes de nanocelulosa.

Al utilizar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> durante la hidrólisis se puede asegurar la oxidación, como se mostró anteriormente en el caso de la nanocelulosa bacteriana (otro material sin lignina) donde el pico de 1722  $cm^{-1}$  aparece después de 10 h de tratamiento ácido (Flores-Jerónimo et al. 2021) creando grupos carboxilo, obteniendo nanocelulosa oxidada. Resultados similares mostraron una transmitancia del 69% cuando se utilizó celulosa de *Sargassum natans* (Doh et al. 2020) para producir películas (espesor 0.039 mm), con la característica de que la película conserva el color marrón de la materia prima original. Además, si se agrega celulosa de sargazo a algunos tipos de alimentos como sustituto (Ren et al. 2020) o modificador de viscosidad (Gao et al. 2018), puede mejorar la procesabilidad sin cambiar el color. La transmisión de luz en el rango visible toma gran importancia, principalmente al no cambiar el color del producto final, atendiendo a la percepción del consumidor, demostrando que la celulosa biodegradable tiene un gran potencial para sustituir parcialmente a los polímeros derivados del petróleo.

Los picos en la Figura 5 se ven bien definidos, a diferencia de la materia prima (no se muestra), que puede estar llena de células de algas (Arnold et al., 2015), esto puede ser consecuencia de la extracción exitosa de celulosa. La mayor parte de la literatura reciente no reporta la celulosa en combinación con los otros polisacáridos, principalmente porque no es el producto objetivo obtenido de las algas pardas (Devault et al. 2020), siendo el alginato, laminarina o fucoidanos el principal interés para la mayoría de las aplicaciones. Sin embargo, se han reportado algunas aplicaciones en plásticos de base biológica (Devault et al. 2020, Mouritsen et al. 2020), con algunos inconvenientes regulatorios, especialmente cuando la celulosa se usa en aplicaciones de empaque o productos en contacto directo con cualquier tipo de alimento. Los resultados de RMN concuerdan con los resultados de FTIR, donde solo se detectaron proteínas y celulosa en el producto final (película). El doble pico en los espectros de RMN identificado como C4, está relacionado con las fases

cristalina (89 ppm) y amorfa (85 ppm) presentes en la celulosa, donde la fracción cristalina suele parecer mayor, como se reportó anteriormente (Chavez-Guerrero et al. 2021). El índice de cristalinidad es de  $CrI \Gamma 49$ , esto indica la presencia de una gran cantidad de material amorfo alrededor de las nanofibrillas entrelazadas (Figura 6), lo que hace que las nanoláminas mantengan su forma plana (Figura 7) incluso después del tratamiento con ácido. Esto se puede atribuir a la leve hidrólisis, debido a la baja cantidad de ácido utilizado durante el tratamiento final, lo que ayuda al medio ambiente al reducir la cantidad de reactivo utilizado para aislar la nanoestructura. Las nanoláminas de celulosa se aislaron directamente de las paredes celulares de las algas pardas, manteniendo la forma plana con el entrelazamiento original de las nanofibrillas de celulosa. Como se puede observar en la Figura 6, las nanofibrillas de celulosa quedaron expuestas en la superficie de la nano, esto se debe a la remoción de todos los materiales no celulósicos, originalmente presentes en la materia prima. Quizás, la presencia de proteína en la película pueda explicarse por el pequeño tamaño de la proteína (Vasquez et al. 2019), la cual puede quedar atrapada en la red de nanofibrillas de celulosa, ya que no es soluble como los demás componentes de las algas, por tanto, todavía queda una pequeña fracción de proteína, como lo muestran FTIR y RMN, lo que no afecta la transparencia de la película final de nanocelulosa. Además, la cantidad reducida de agua utilizada durante el proceso de lavado y neutralización evita la extracción de proteínas, que normalmente se lleva al sobrenadante después de la centrifugación o precipitación.

La mayoría de las aplicaciones de biopolímeros requieren que la nanocelulosa forme una forma específica (platos, pajitas, recipientes, bolsas, etc.); por tanto, de nada sirve obtener las nanofibrillas de celulosa individuales, si al final esas nanofibrillas deben volver a enredarse para obtener un producto. Al aislar las NLC de varias fuentes en condiciones ecológicas, podemos ahorrar energía, tiempo y productos químicos para obtener resultados similares, sin usar procesos largos de varios pasos. Una gran ventaja de la nanocelulosa es la falta de contaminación una vez que el producto se elimina en el medio ambiente, como se demostró anteriormente para un tipo similar de nanoláminas de celulosa (Chavez-Guerrero et al. 2021). Por lo tanto, esperamos que las NLC se degraden más rápido por las enzimas en un vertedero o en una producción de composta (Flores-Jerónimo et al. 2021).

## Conclusiones

La aplicación de un proceso en un solo recipiente “one pot” permitió el aislamiento de nanocelulosa 2D utilizando *Sargassum spp.* por primera vez, asegurando la producción de una película de biopolímero con una transmitancia del 81%. Se corroboró el correcto aislamiento de las nanoláminas de celulosa mediante ATG, RMN y FTIR, eliminando compuestos no celulósicos y mostrando el aspecto de las muestras en cada paso del proceso para obtener un rendimiento del

14,9%. Finalmente, los perfiles de altura MEB y MBL demostraron que las nanoláminas tienen un grosor de  $\approx 100$  nm, que están hechas de nanofibrillas de celulosa entrelazadas. Además, las imágenes de un microscopio óptico corroboran la presencia de las nanopartículas en forma de lámina con un  $CrI \approx 49$ , lo que explica las propiedades que muestra el gel utilizado para formar la película transparente.

La alta transmitancia de la película de nanocelulosa se puede explicar en función de la morfología de la celulosa. Como se describió anteriormente (Chávez-Guerrero et al. 2021), las nanoláminas de celulosa se ensamban mediante nanofibras de celulosa entrelazadas o nanoagregados de celulosa (NAC), rodeados de celulosa amorfa, formando una estructura similar a una nanolámina, como se ve en la Figura 6 (a, b). Tales nanoestructuras pueden observarse con un microscopio óptico y medirse y detectarse fácilmente cuando se depositan en una oblea de silicio (incluso un NAC pequeño); esta propiedad facilita la caracterización, evitando la tinción habitual de la muestra y el uso de equipos avanzados, como el microscopio de fuerza atómica y el microscopio electrónico de barrido. Como se muestra en la Figura 7c, el grosor de las nanoláminas fue de aproximadamente  $\approx 100$  nm, medido a partir de un perfil de altura (Figura 7b), que verdaderamente puede considerarse una nanoestructura, por definición ( $\leq 100$  nm) y comportamiento (alta transmitancia). El color de interferencia constructiva detectado por el MO puede ser utilizado para medir el espesor de la nanolámina (Chávez-Guerrero et al. 2021), teniendo entonces una relación directa entre color y espesor que facilita su posterior análisis, abriéndose a vastas condiciones y variaciones en estudios posteriores de hidrólisis ácida o enzimática de nanocelulosa.

Finalmente, un proceso llevado a cabo en un solo recipiente “one pot” para aislar nanoláminas de celulosa altamente amorfas (un biopolímero) utilizando *Sargassum spp.* muestra un gran potencial, principalmente por la simplicidad del procedimiento, la falta de preparación complicada durante la caracterización, la aplicabilidad a otras materias primas y, finalmente, las múltiples aplicaciones disponibles debido a la alta transmitancia del material si se utiliza como aditivo alimentario o en embalaje.

## Agradecimientos

A. S. Vázquez-Rodríguez por el análisis UV-Vis. También el apoyo del programa PAICyT a través de la beca IT1054-19 de la UANL.

## Referencias

- Abdul Khalil H, Tye Y, Saurabh C et al. (2017) Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material. *Express Polymer Letters* 11:244-265. doi: 10.3144/expresspolymlett.2017.26
- Anastasakis K, Ross A, Jones J (2011) Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macroalgae. *Fuel* 90:598-607. doi: 10.1016/j.fuel.2010.09.023
- Arnold A, Genard B, Zito F, Tremblay R, Warschawski D. and Marcotte I (2015). Identification of lipid and saccharide constituents of whole microalgal cells by 13C solid-state NMR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848: 369-377. doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.07.017
- Brownlee I, Chater P, Pearson J, Wilcox M (2017) Dietary fibre and weight loss: Where are we now. *Food Hydrocolloids* 68:186-191. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.08.029
- Chávez-Guerrero L, Vazquez-Rodriguez S, Salinas-Montelongo J et al. (2019) Preparation of all-cellulose composites with optical transparency using the banana pseudostem as a raw material. *Cellulose* 26:3777-3786. doi: 10.1007/s10570-019-02369-1
- Chávez-Guerrero L, Silva-Mendoza J, Toxqui-Terán A et al. (2021) Direct observation of endoglucanase fibrillation and rapid thickness identification of cellulose nanoplatelets using constructive interference. *Carbohydrate Polymers* 254:117463. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117463
- Chávez V, Uribe-Martínez A, Cuevas E et al. (2020) Massive Influx of Pelagic *Sargassum spp.* on the Coasts of the Mexican Caribbean 2014–2020: Challenges and Opportunities. *Water* 12:2908. doi: 10.3390/w12102908
- Cui Q, Zheng Y, Lin Q et al. (2014) Selective oxidation of bacterial cellulose by NO<sub>2</sub>–HNO<sub>3</sub>. *RSC Adv* 4:1630-1639. doi: 10.1039/c3ra44516j
- Cui Y, Gao S, Zhang R et al. (2020) Study on the Moisture Absorption and Thermal Properties of Hygroscopic Exothermic Fibers and Related Interactions with Water Molecules. *Polymers* 12:98. doi: 10.3390/polym12010098
- Devault D, Pierre R, Marfaing H et al. (2020) *Sargassum* contamination and consequences for downstream uses: a review. *Journal of Applied Phycology* 33:567-602. doi: 10.1007/s10811-020-02250-w
- Doh H, Dunno K, Whiteside W (2020) Preparation of novel seaweed nanocomposite film from brown seaweeds *Laminaria japonica* and *Sargassum natans*. *Food Hydrocolloids* 105:105744. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105744
- Flores-Jerónimo G, Silva-Mendoza J, Morales-San Claudio P et al. (2021) Chemical and Mechanical Properties of Films Made of Cellulose Nanoplatelets and Cellulose Fibers Obtained from Banana Pseudostem. Waste and Biomass Valorization. doi: 10.1007/s12649-021-01377-2
- Gao H, Duan B, Lu A et al. (2018) Fabrication of cellulose nanofibers from waste brown algae and their potential application as milk thickeners. *Food Hydrocolloids* 79:473-481. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.01.023
- Kim S, Ly H, Kim J et al. (2013) Thermogravimetric characteristics and pyrolysis kinetics of Alga *Sargassum sp.* biomass. *Bioresource Technology* 139:242-248. doi: 10.1016/j.biortech.2013.03.192
- Lee MK, Ryu H, Lee YJ et al. (2022) Potential Beneficial Effects of *Sargassum spp.* in skin aging. *Marine drugs* 20(8): 540. doi: 10.3390/md20080540
- Li J, Zhu Y, Wang C et al. (2020) Golden seaweed tides from beach inundations as a valuable sustainable fuel resource: Fast pyrolysis characteristics, product distribution and pathway study on *Sargassum horneri* based on model compounds. *Algal Research* 48:101888. doi: 10.1016/j.algal.2020.101888
- Mohamad Haafiz M, Hassan A, Zakaria Z et al. (2013) Physicochemical characterization of cellulose nanowhiskers extracted from oil palm biomass microcrystalline cellulose. *Materials Letters* 113:87-89. doi: 10.1016/j.matlet.2013.09.018
- Mouritsen O, Rhatigan P, Cornish M et al. (2020) Saved by seaweeds: phyconomic contributions in times of crises. *Journal of Applied Phycology* 33:443-458. doi: 10.1007/s10811-020-02256-4
- Núñez-Carmona E, Bertuna A, Abbatangelo M et al. (2019) BC-MOS: The novel bacterial cellulose based MOS gas sensors. *Materials Letters* 237:69-71. doi: 10.1016/j.matlet.2018.11.011
- Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, and Johnson DK (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels* 3:1-10. doi.org/10.1186/1754-6834-3-10
- Ren Y, Linter B, Foster T (2020) Starch replacement in gluten free bread by cellulose and fibrillated cellulose. *Food Hydrocolloids* 107:105957. doi: 10.1016/j.foodhyd.2020.105957
- Schell J, Goodwin D, Siuda A (2015) Recent *Sargassum* Inundation Events in the Caribbean: Shipboard Observations Reveal Dominance of a Previously Rare Form. *Oceanography* 28:8-10. doi: 10.5670/oceanog.2015.70



Sterner M, Edlund U (2016) Multicomponent fractionation of *Saccharina latissima* brown algae using chelating salt solutions. *Journal of Applied Phycology* 28:2561-2574. doi: 10.1007/s10811-015-0785-0

Vásquez V, Martínez R and Bernal C (2019). Enzyme-assisted extraction of proteins from the seaweeds *Macrocystis pyrifera* and *Chondracanthus chamissoi*: characterization of the extracts and their bioactive potential. *Journal of Applied Phycology* 31(3): 1999-2010. doi.org/10.1007/s10811-018-1712-y

Wang M, Hu C, Barnes B et al. (2019) The great Atlantic *Sargassum* belt. *Science* 365:83-87. doi: 10.1126/science.aaw7912

Wargacki A, Leonard E, Win M et al. (2012) An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. *Science* 335:308-313. doi: 10.1126/science.1214547

Zhang T, Zhang Y, Wang X et al. (2018) Characterization of the nano-cellulose aerogel from mixing CNF and CNC with different ratio. *Materials Letters* 229:103-106. doi: 10.1016/j.matlet.2018.06.101