



Microalgas para la extracción de celulosa de alta pureza

Autor: Ana Moral Rama

Institución: Universidad Pablo de Olavide

Otros autores: María López Alonso (Universidad Pablo de Olavide), María José Fernández Rodríguez (Universidad Pablo de Olavide), María Dolores Hernández de la Torre (Universidad Pablo de Olavide), Antonio Tijero Cruz (Universidad Complutense de Madrid), María Jesús de l

Resumen

Cientos de empresas dedican sus esfuerzos a la búsqueda de soluciones ante la crisis energética y medioambiental actual. En éste punto, cobran especial relevancia el estudio de biocombustibles. A partir de microalgas pueden extraerse combustibles de segunda generación que eliminan todos los problemas derivados de la utilización de vegetales alimenticios. La mayoría de las investigaciones se centran en la obtención de biodiesel a partir del aceite acumulado por estos microorganismos, sin embargo, existen numerosas aplicaciones. Entre ellas, las microalgas son capaces de acumular grandes cantidades de celulosa, libre de lignina, lo que supone una materia prima nueva, limpia y fácil de extraer capaz de paliar los principales problemas medioambientales actuales asociados a la obtención de este polímero. La celulosa algica presenta características físicas y estructurales similares a las de la celulosa nativa de plantas terrestres, así como un alto grado de cristalinidad, lo que extiende su aplicación a campos que van desde su consumo directo, aditivos alimenticios, hasta fibras de refuerzo en materiales de construcción. Las aplicaciones más novedosas contemplan su uso en formulaciones tópicas antimicrobianas con fines farmacéuticos, cosméticos o en campos hasta ahora inexplorados como la ingeniería de nuevos materiales y la fabricación de papel. La ventaja de usar microalgas es que combinan el mecanismo fotosintético de las plantas con una estructura mucho más simple, lo que le proporciona ventajas de crecimiento excepcionales. La sustitución de la celulosa tradicional por la celulosa microalgal preserva los ecosistemas de la tala masiva de árboles, disminuye las emisiones de CO₂ y no afecta al mercado de alimentos. Finalmente, las plantas de producción pueden establecerse en zonas desérticas o improductivas para cualquier otro tipo de vegetal y no requieren condiciones climáticas específicas ni grandes superficies de cultivo.

Palabras claves: Microalgas, celulosa, antimicrobiano, farmacéutico

INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones de la celulosa vegetal son innumerables, y abarcan desde aplicaciones tradicionales como la producción de papel hasta su utilización en ingeniería de nuevos materiales. La fuente tradicional de celulosa ha sido siempre la madera de árboles y especies vegetales superiores. Sin embargo, dada la crisis energética y medioambiental que nos sucede, cada vez son más los esfuerzos destinados en industria e investigación orientados a la búsqueda de materias primas alternativas y nuevos métodos de extracción que no supongan una mayor degradación y transgresión del ecosistema (Jiménez et al., 2005a; Jiménez et al., 2006; Jiménez et al., 2007a; Rodríguez et al., 2008a; Rodríguez et al., 2008b; Rodríguez et al., 2009a).

En los últimos años se han publicado gran cantidad de estudios y patentes que consiguen recuperar o extraer celulosa a partir de residuos agro-industriales (Flauzino et al., 2013), plantas no leñosas (Alila et al., 2013), bagazo (Li et al., 2012) e incluso lodos (Jonoobi et al., 2012) y bacterias (Yang et al., 2012). Sin embargo, no se han encontrado indicios recientes del uso de microalgas para tal fin. Además de ello, está cobrando gran relevancia la utilización de procesos mínimamente contaminantes en la extracción de la celulosa (Tijero et al., 2012)

La pared celular de la mayoría de microalgas, al igual que la de otros vegetales superiores, está formada en su mayor parte por celulosa y pectinas, una pequeña proporción de hemicelulosas y otros componentes anecdóticos como quitina o sílice.

A diferencia de los vegetales superiores en la pared celular de estos organismos rara vez aparece lignina. La lignina es un compuesto aromático muy complejo que se intercala entre las microfibrillas de celulosa para dar consistencia a las células de plantas herbáceas y leñosas (Jiménez et al., 2007b; Jiménez et al., 2008a; Jiménez et al., 2008b; Rodríguez et al., 2009c; Tijero et al., 2009; Moral, et al., 2010 ; Tijero et al. 2011).

Al ser organismos acuáticos, las microalgas carecen prácticamente de lignina en su pared celular, lo cual facilita y abarata la extracción de celulosa a partir de las mismas, garantizando, además, su pureza e integridad.

En este trabajo se pretende desarrollar un protocolo para la extracción de fibras de celulosa a partir de microalgas. La reducción de tratamientos secundarios para la eliminación de lignina, hace de éste protocolo un método más limpio que los tradicionales, ya que reduce considerablemente el volumen y la carga contaminante de los residuos generados, sin contar con la reducción de energía y agua consumidas al eliminar etapas en el proceso.

REVISIÓN

La celulosa algal posee propiedades químicas y estructurales muy similares a la celulosa extraída de plantas terrestres, de manera que podría sustituir a esta en multitud de aplicaciones. Está constituida por monómeros de D-Glucosa y muestra patrones de difracción de Rayos X análogos a los de la celulosa extraída del algodón (Percival et al., 1949).

Tanto la celulosa de las clorofitas como la procedente de plantas terrestres, exhiben el mismo comportamiento elástico ante la aplicación de tensión (Astbury et al., 1940), sin embargo, posee un grado de cristalinidad excepcionalmente alto (Mihriyan et al., 2011), para hacer frente a las grandes tensiones osmóticas originadas por la salinidad del agua (Jonson et al., 2004). Sus propiedades tensiles dependen de la época del año en que sean medidas, pero extraída de algas adecuadas a mitad de la época de crecimiento poseen altos valores de resistencia (Johnson et al., 1996).

Por todo ello las microalgas suponen una fuente excelente de este polímero que puede ser utilizado en una variedad de aplicaciones y, en algunos casos, optimizar la utilización de celulosa vegetal tradicional.

De forma paralela, el cultivo de microalgas conlleva toda una serie de ventajas adicionales:

- ✓ Son capaces de crecer en medios de cultivo baratos de forma continuada.
- ✓ Bajo condiciones adecuadas, se desarrollan a gran velocidad y completan su ciclo de vida en un tiempo mucho menor que los cultivos tradicionales.
- ✓ Su producción reduce las emisiones de CO₂ en la atmósfera. Son más eficientes que las plantas en la captura de CO₂ atmosférico; Por cada 100 ton de microalgas producidas, se consumen 183 ton de CO₂ (Chisti, 2007).
- ✓ No afecta al mercado de alimentos.
- ✓ Preserva los ecosistemas de la tala masiva de árboles.
- ✓ Las plantas de producción no tienen requisitos especiales y pueden implantarse en zonas desérticas o improproductivas sin requerir condiciones climáticas específicas o grandes superficies de cultivo.

Actualmente, la mayoría de las investigaciones para el cultivo y utilización de microalgas se encuentran encaminadas a la producción de biocombustibles: la crisis energética, los problemas de emisiones de CO₂, y aquellos que derivan de la degradación de los ecosistemas y el uso de cultivos alimenticios, son las claves del avance en investigación y producción de biocombustibles (Amaro, et.al, 2012; Menetrez, M.Y. 2012; Jones et al. 2012). El bioetanol es el combustible líquido más utilizado en la actualidad y se obtiene por fermentación de azúcares a partir de biomasa vegetal, por lo que la celulosa algal representa una materia prima muy atractiva para la producción de biocarburantes gracias a su alta pureza, biodegradabilidad y bajo coste (de la Torre et al., 2012). No obstante, señaladas las propiedades eléctricas, mecánicas y químicas que posee, resulta igual de interesante su aplicación en el diseño e ingeniería de nuevos materiales o “materiales inteligentes”.

Se ha ensayado la utilización celulosa de macro-algas como fibras de refuerzo en la fabricación de espumas de poliuretano, y ha demostrado mejorar la elasticidad, resistencia, propiedades térmicas y de color en materiales de construcción, así como una disminución del coste de producción y una mayor biodegradabilidad (Jonson et al., 2004).

La base principal para la fabricación de membranas y papeles de filtro es también celulosa, existen métodos patentados que describen propiedades nativas de la celulosa algal, como rápida disolución y precipitación, que resultan excepcionales para la preparación de membranas con aplicación industrial (Mitsuo et al., 1996a; Mitsuo et al., 1996b; López-Simeón et al., 2011).

Su alto grado de cristalinidad, con respecto a la celulosa de plantas terrestres, disminuye la absorción de humedad, debido al hecho de que la humedad es absorbida, principalmente, en las zonas amorfas de la red fibrilar (Howsman, 1949). Además, en forma de polvo, la celulosa de algunas microalgas tiene un área superficial considerablemente alta, lo que la equipara a otros absorbentes industriales (Mihranyan et al., 2004a). Estas dos últimas propiedades la presentan como un componente ideal en la fabricación de hidrogeles y medicamentos, en su aplicación de excipiente y regulador de la viscosidad. En forma de polvo, forma geles a concentraciones mucho más bajas que otras celulosas comerciales (Mihranyan et al., 2007), y su utilización como excipiente en la fabricación de fármacos ha conseguido comprimidos más fuertes y duraderos (Gustafsson et al., 2003).

En parafarmacia y cosmética la celulosa de algas ha sido utilizada además de gelificante en cremas, lociones y champús, (Mihranyan A. 2011) como elemento funcional en otros cosméticos (Almirall Díaz et al., 2004). Trabajos recientes demuestran que la celulosa con alto grado de cristalinidad mejora las propiedades de sedosidad, recubrimiento, homogeneidad en el color, duración y adherencia a la piel en polvos compactos y cremas (Rojas J., 2012).

Además de las aplicaciones mencionadas, la celulosa presenta un potencial mercado en la fabricación de papel. La ventaja principal del uso de microalgas para la elaboración de papel es que carecen de lignina en su pared celular, de manera que su utilización en este campo elimina todos los problemas derivados de la separación y destrucción de la lignina en el blanqueo y pasteo del papel. (Jiménez et al., 1996a; Jiménez et al., 1996b; Jiménez et al., 1997; Jiménez et al., 1997b; Jiménez et al., 2005b)

Se ha comprobado la capacidad de las algas para producir celulosa con propiedades adecuadas para la fabricación de papel (Mihranyan et al., 2004b; Ververis et al., 2007), y existen métodos patentados (Sakai M. et al., 1996; You et al., 2009) y trabajos (Kiran et al., 1980; Chao et al., 2000) que reportan la utilización de fibra de microalgas para la elaboración papel y derivados. Además, la celulosa algal presenta un grado de hornificación excepcionalmente bajo (Mihranyan et al., 2007) lo que la hace idónea para su utilización como fibras de refuerzo en la elaboración de papel virgen y reciclado.

A pesar de todas las aplicaciones mencionadas, y quizás por ser fuente de alimento y otros principios activos, la celulosa de microalgas no parece tener la posición que se merece ni en el mercado ni en el campo de la investigación de la industria papelera.

Los estudios mencionados corresponden a especies puntuales y son desarrollados casi siempre por los mismos grupos por lo que no existe una clasificación de las especies atendiendo a tal característica, ni un protocolo eficiente de extracción de celulosa a partir de estos microorganismos.

Es por ello que el presente trabajo se encuentra encaminado hacia la consecución de tres objetivos principales:

1. Determinar las especies idóneas para la extracción y recolección de celulosa.
2. Establecer las condiciones y elementos de cultivo óptimos para la producción de celulosa micro-algal.
3. Diseñar un protocolo de extracción de celulosa a partir de microalgas de alto rendimiento.

1. Determinar las especies idóneas para la extracción y recolección de celulosa.

La mayoría de las algas unicelulares poseen paredes celulares con celulosa como componente base; la principal diferencia con otros vegetales superiores es el grado de cristalización de las microfibrillas de celulosa, considerablemente más alto en microalgas. No existen revisiones bibliográficas que reflejen el porcentaje de celulosa de las principales algas que se cultivan en la actualidad sin embargo se pueden establecer patrones diferenciales en cuanto a la pared celular de determinados grupos:

Pared celular con predominio de mananos: algas rojas y algunas algas verdes.

Dominancia de alginatos: son los principales componentes de las paredes de feofitas o algas pardas.

Predominio de celulosa: la mayoría de las algas verdes tienen un porcentaje de celulosa en su pared de hasta el 70% en peso seco (Sendbusch, P. S. 2003).

Teniendo en cuenta las citadas diferencias, se plantea como primera aproximación, la extracción de celulosa a partir de microalgas Clorofitas o algas verdes.

Por otro lado, **los géneros que tradicionalmente, han reportado mayores porcentajes de celulosa son:**

Chlorella: Su pared celular está compuesta en un 80% de carbohidratos, principalmente celulosa. El rendimiento de celulosa extraído depende de la especie, el método de cultivo y el protocolo de extracción, pero se han publicado porcentajes del 15-4% de celulosa y del 31-0% de hemicelulosa en Chlorella pyrenoidosa (Northcote et al., 1958).

Algas utilizadas para la elaboración de pulpa de papel: aunque no se ha encontrado el porcentaje específico de cada especie, existen métodos patentados para la elaboración de pulpa de papel y suplementos a partir de los siguientes géneros: Closterium, Pleurotaenium, Ulothrix, Microspora, Stigeoclonium, Oedogonium y Scenedesmus. El método descrito revela porcentajes de celulosa y hemicelulosa de 7,1 y 16,3, respectivamente (Ververis et. al., 2007).

2. Establecer las condiciones y elementos de cultivo óptimos para la producción de celulosa micro-algal.

Otro de los factores determinantes para la obtención de la celulosa algal, son las condiciones de cultivo de dichos microorganismos.

Los parámetros más importantes en el crecimiento de las algas son (Lavens & Sorgeloos 1996):

- Cantidad y calidad de nutrientes, que viene determinado por la preparación del medio de cultivo
- Luz
- pH
- Aireación
- Salinidad
- Temperatura

El rango óptimo y/o tolerado para cada uno de estos factores, varían según la especie cultivada, y aunque pueden establecerse una serie de generalizaciones, a menudo, estos factores son interdependientes, y los valores más eficientes para un conjunto de condiciones o producción, no tienen por qué serlo para otra (Lavens & Sorgeloos 1996).

Aunque existen “recetas generales” y medios de cultivos ampliamente utilizados, el medio de cultivo final viene determinado por los requerimientos concretos de la especie a cultivar así como el objeto o metabolito a extraer. En el caso concreto de *Chlorella* sp., existen estudios premilinares que presentan al medio BG-11 como el más adecuado para la producción de biomasa (Bold et al, 1949 y Watanabe et al, 2000). Sin embargo, en otros trabajos con la misma especie el medio varía según el objeto final del cultivo (Bhola et al, 2011, Fu et al, 2012, Kong et al, 2012; Li et al 2011).

Para cada especie elegida se tendrán en cuenta el medio y las condiciones descritas en otros trabajos que reporten el máximo crecimiento del cultivo, sin embargo, con objeto de aumentar la cantidad de celulosa producida, fin último de nuestro trabajo, conviene considerar una serie de puntualizaciones a las condiciones estándar:

2.1. Metabolismo inducido.

Según la fuente de carbono utilizada, la algas pueden crecer siguiendo tres vías metabólicas distintas: fotoautotrofica, heterotrófica y mixotrófica (Becker, 1994) de manera que son capaces de producir celulosa a partir de dos vías distintas separadas o por una combinación de las mismas:

En la ruta fotosintética, el CO₂ generado en el metabolismo de la glucosa, puede ser reutilizado en presencia de luz para sintetizar monosacáridos, algunos de los cuáles van destinados a la producción de celulosa (Makooi et al., 1976).

En la ruta heterótrofa, la celulosa y otros carbohidratos son sintetizados a partir de glucosa exógena (Droop, 1974).

Y, finalmente, los organismos que crecen en mixotrofia, tiene activas las dos rutas (Kaplan et al., 1986; Lee, 2004) por lo que experimentan un aumento en la cantidad de celulosa producida por unidad de superficie (Makooi et al., 1976).

Manipulando las condiciones de cultivo podemos inducir un tipo de metabolismo u otro. Para lograr que las células crezcan en mixotrofia y obtener un mayor rendimiento, además de procurar la cantidad de luz adecuada al medio, se añadirá una fuente de carbono orgánico como glucosa o acetato; Los resultados publicados muestran que con un aporte del 1% de glucosa al medio se incrementa la producción de celulosa hasta en el 1,6 % en peso seco de alga para *Chlorella pyrenoidosa* (Makooi et al., 1976).

2.2. Aireación.

Con objeto de evitar la sedimentación de las células y asegurar que todas queden igualmente expuestas a la luz y a los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire, los cultivos deben mantenerse en continua agitación (Lavens & Sorgeloos 1996).

En nuestro caso éste intercambio es especialmente importante, ya que pretendemos aumentar la síntesis de un producto que es consecuencia directa de la fotosíntesis, la celulosa. El aire contiene la fuente de carbono y oxígeno necesarios para la fotosíntesis, de manera que con objeto de aumentar la producción a partir de esta vía, el aire insuflado al cultivo puede suplementarse con CO₂.

Los estudios demuestran que el aumento de CO₂ en el medio de cultivo es capaz de aumentar la productividad de las microalgas (Bholá et al, 2010; Chiu et al 2009).

Cuando se cultivan en presencia de aire con un 6-8% en CO₂, el rendimiento de biomasa es de hasta 0,376 g / l*día, mientras que para concentraciones mayores del 9% el rendimiento se reduce hasta 0,15 g / l*día (Lee et al 1996; Doucha et al, 2005). Generalmente los cultivos se airean con un 4-5% de CO₂ para tal fin (Bholá et al 2011, Makooi et al 1975)

2.3. Fotoperíodo e intensidad lumínica.

Otro factor determinante en la productividad del cultivo es el fotoperíodo o el tiempo de luz:oscuridad que soportan las células. Al ser organismos fotosintéticos el tiempo de luz de que disponen las microalgas, determinará la tasa de crecimiento de las mismas, y existen trabajos que evalúan la producción de biomasa al incrementar las horas de exposición a la luz del cultivo, demostrando un efecto directo entre ambas (Shannon et al, 2005).

Se han ensayado distintos regímenes de luz:oscuridad en cultivos de microalgas (Khoji et al, 2009; Mohsenpour et al., 2012; Qian et al, 2010; Shannon et al, 2005), teniendo en cuenta aquellos que reportan mayores tasas de crecimiento y producción fotosintética (Shannon et al, 2005; Makooi et al 1975) se ensayaran condiciones de 16:8 y 24:0 luz:oscuridad, con idea de maximizar la producción fotosintética de monosacáridos y por lo tanto el aporte de celulosa por esta vía.

La intensidad óptima de luz depende de la especie en cultivo, ya que requieren más o menos energía para llevar a cabo la fotosíntesis, Según la especie y la etapa de cultivo se aplican intensidades que van desde 76 a 600 $\mu\text{Mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Illman et al.,2000; Hsieh et al, 2009).

En el caso de *Chlorella vulgaris*, la tasa fotosintética óptima varía desde 150 a 350 $\mu\text{Mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Bhola et al, 2011), de manera que este será el rango escogido para nuestros experimentos con *Chlorella*.

2.4. Momento de extracción de la celulosa.

El último factor a tener en cuenta en cuenta, en cuanto a las condiciones de cultivo, es la fijación del momento de extracción

En 1996, Johnson et al. demostraron que los filamentos de *Cladophora* extraídos al principios de la temporada de crecimiento son más pequeños que los obtenidos a mitad de temporada, y presentan una menor resistencia a la tracción, de éste modo, el momento ideal para llevar a cabo la extracción de celulosa sería en la mitad de la época de crecimiento, no obstante consideramos interesante obtener muestras de celulosa en distintos momentos del cultivo a fin de determinar cuál es el mejor momento para realizar la extracción y cuáles son las características de la celulosa en cada período.

3. Diseñar un protocolo de extracción de celulosa a partir de microalgas de alto rendimiento.

Existen protocolos de extracción de celulosa a partir de macro- y microalgas; en la mayoría de los casos, el método depende de la especie utilizada y del uso para el que se destine la celulosa extraída. Sin embargo, aun no existe una tecnología simple y eficiente que extienda su aplicación. Nos planteamos por lo tanto realizar una revisión de los principales métodos de extracción a fin de determinar aquel que reporta un mayor rendimiento.

De forma general, tanto en algas como en vegetales superiores, los medios de extracción utilizados hasta el momento pueden dividirse en dos (Villar et al., 2005; de la Torre et al., 2005; Pérez et al., 2005; Rodríguez et al., 2008c): tratamientos mecánicos y químicos.

3.1. Extracción mecánica.

Se ha utilizado para la extracción de celulosa a partir de vegetales superiores, tunicados, bacterias y algas (Moon et al., 2011), y se valen de sistemas mecánicos como homogeneizadores de alta presión, molinos, refinadores, tratamientos de ultrasonidos, criofactura y microfluidización para la separación y eliminación de la celulosa del resto de componentes celulares.

En general, producen un alto cizallamiento que provoca la escisión transversal a lo largo del eje longitudinal de la estructura de la celulosa microfibrilar, resultando en la extracción de fibrillas de celulosa largas, que se conocen como celulosa microfibrilada.

Los materiales deben pasar por el tratamiento mecánico varias veces y, con cada pasada, se disminuye el tamaño de las fibras obtenidas y su cristalinidad (Iwamoto et al., 2007), de manera que dependiendo del fin último de la extracción, se llevarán a cabo un determinado número de pases. En muchos casos la celulosa extraída debe ser filtrada y/o tratada secundariamente de forma química para extraer las regiones amorfas o funcionalizar la superficie de las fibras (Villar et al., 2005).

3.2. Extracción química.

Los procesos químicos de extracción se han utilizado para una gran variedad de organismos, (Jiménez et al., 1999; Jiménez et al., 2000a; Jiménez et al., 2000b; Jiménez et al., 2008b; Jiménez et al., 2008c; Rodríguez et al., 2009b; Moral et al., 2012) incluido nuestro grupo de estudio, las algas. En este bloque pueden contemplarse varios métodos ensayados:

Hidrólisis ácida: el material purificado se mezcla en agua desionizada con una concentración de ácido determinada. Generalmente se utiliza ácido sulfúrico ya que produce una carga superficial negativa sobre las partículas y estabiliza la suspensión (Habibi et al, 2010), pero también se han utilizado otros ácidos como clorhídrico (Wang & Sain, 2007) o maleico (Filson & Dawson-Andoh, 2009)

Tras el tiempo de reacción estipulado, la mezcla se diluye con agua desionizada para inactivar la reacción. Finalmente, el material extraído se somete a una serie de procesos de separación y lavado, para retirar el ácido restante.

Hidrólisis alcalina: En un proceso similar a la hidrólisis ácida, la biomasa algal previamente desecada, se mezcla con soluciones alcalinas. El compuesto más usado es el hidróxido de sodio (Ibrahim et al, 2010; Sakai et al, 1996) aunque también se han utilizado hidróxidos de potasio, solos o en una mezcla combinada de ambos (Zuluaga et al., 2009).

Hidrólisis enzimática: se han encontrado referencias en metodología de determinación de fibras alimentarias aplicadas a vegetales superiores que, debido a su inocuidad, cobra especial relevancia como posible aplicación a la extracción de celulosa algica. El material recolectado y pretratado se somete a una solubilización enzimática que disuelve todos aquellos componentes que no son fibras. El residuo que queda tras la solubilización, filtrado y tratado según su destino, contendrá todas las fibras insolubles de la biomasa. (Pak N. 1997; Siró & Plackett, 2010).

Método combinado: descrito por Mihranyan et al. (2004), se ha utilizado tanto para la extracción a partir de polvo seco de macroalgas (Siddhanta et al, 2009; Mihranyan et al 2004) como para la extracción de celulosa desde residuos algales (Lopez-Simeon et al. 2011). El procedimiento consiste en un primer lavado metanólico, en condiciones neutras, ácidas o básicas, para eliminar las grasas, seguido de un proceso de blanqueado y varios lavados ácidos y básicos.

Para la producción de pulpa de papel existe un método, poco ensayado, que consiste en la separación de la pared celular, el blanqueamiento y expulsión de la clorofila y otros componentes celulares a través de la inyección de Ozono al 1% durante 5 minutos, que comporta una extracción de pulpa de más del 90% en peso seco del alga (Sakai et al, 1996)

En los trabajos revisados, se han publicado rendimientos muy variados y siempre dependen de la especie analizada, por lo que uno de los objetivos secundarios de este trabajo es determinar, en las mismas condiciones de partida, el método de extracción más eficiente o aquellas condiciones que conducen a un mejor aprovechamiento y extracción de las fibras, con el fin de presentar un protocolo único, sencillo, limpio y eficiente.

BIBLIOGRAFÍA

Alila, S., Besbes, I., Vilar, M.R., Mutjé, P., Boufi, S., 2013. Non-woody plants as raw materials for production of microfibrillated cellulose (MFC): A comparative study. *Industrial Crops and Products*, 41 (1), 250-259.

Astbury, W. T., Preston, R. D., 1940. The Structure of the Cell Wall in Some Species of the Filamentous Green Alga *Cladophora*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 129 (854), 54-76.

Chao, K.P., Su, Y.C., Chen, C.S., 2000. Feasibility of utilizing *Rhizoclonium* in pulping and papermaking. *J. Appl. Phycol.* 12, 53–62.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.

de la Torre, M.J., Gutiérrez, J.C., Jiménez, L., 2005. Pasteado a la sosa. Libro: Fabricación de pastas celulósicas para papel a partir de materias primas alternativas a las convencionales, capítulo 7, 150-173.

de la Torre, M.J., Moral, A., Hernández, M.D., Cabeza, E., Tijero, A., 2012. Organosolv lignin for biofuel. *Industrial Crops and Products* (enviado).

Dhargalkar, V.K., Verlekar, X.N., 2009. Southern Ocean seaweeds: A resource for exploration in food and drugs. *Aquaculture*, 287 (3-4), 229-242.

Flauzino Neto, W.P., Silvério, H.A., Dantas, N.O., Pasquini, D., 2013. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. *Industrial Crops and Products*, 42 (1), 480-488.

Gustafsson, C., Lennholm, H., Iversen, T., Nyström, C., 2003. Evaluation of Surface and Bulk Characteristics of Cellulose I Powders in Relation to Compaction Behavior and Tablet Properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29 (10), 1095-1107.

Habibi, Y., Lucia, L.A., Rojas, O.J., 2010. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110 (6), 3479-3500.

Howsman, J.A., 1949. Water sorption and the poly-phase structure of cellulose fibers. *Textile Res. J.* 19, 152–162.

Iwamoto, S., Nakagaito, A.N., Yano, H., 2007. Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites. *Applied Physics A: Materials Science and Processing*, 89 (2), 461-466.

Jayme G., 1994. Mikro-Quellungsmessungen an Zellstoffen. *Wochenbl. Papierfabr*, 6, 187–194.

Jiménez, L., de la Torre, M.J., Navarro, E., Ferrer, J.L., 1996a. Blanqueo de pastas celulósicas con peróxido de hidrógeno. *Investigación y Técnica del Papel*, 130, 828-838.

Jiménez, L., Navarro, E. de la Torre, M.J., Pérez, I., 1996b. El ozono en el blanqueo de pastas celulósicas para papel. Primera parte. *El Papel*, 59 (11), 50-56.

Jiménez, L., Navarro, E. de la Torre, M.J., Pérez, I., 1997a. El ozono en el blanqueo de pastas celulósicas para papel. Segunda parte. *El Papel*, 60 (12), 31-34.

Jiménez, L., Navarro, E., de la Torre, M.J., 1997b. Blanqueo de pastas celulósicas con oxígeno. *Ingeniería Química*, 334 (4), 79-84.

Jiménez, L., Pérez, I., de la Torre, M.J., García, J.C., 1999. The effect of processing variables on the soda pulping of olive tree wood. *Bioresource Technology*, 69, 95-102.

Jiménez, L., Pérez, I., de la Torre, M.J., García, J.C., 2000a. Kraft pulping of olive wood trimmings: Influence of process variables. *TAPPI Journal*, 83, 89-102.

Jiménez, L., Pérez, I., de la Torre, M.J. y García, J.C., 2000b. Influence of process variables on the properties of pulp and paper sheets obtained by sulphite pulping of olive tree wood. *Wood Science and Technology*, 34, 135-149.

Jiménez, L., Ramos, E., Rodríguez, A., de la Torre, M.J. and Ferrer, J.L., 2005a. Optimization of pulping conditions of abaca. An alternative raw material for producing cellulose pulp (2005). *Bioresource Technology*, 96, 977-983.

Jiménez, L., Ramos, E., de la Torre, M.J., Ferrer, J.L., 2005b. ECF and TCF Bleaching Methods as Applied to Abaca Pulp. *Afinidad*, 62 (515), 14-21.

Jiménez, L., Pérez, A., Rodríguez, A., de la Torre, M.J., 2006. New Raw Materials and Pulping Processes for Production of Pulp and Paper. *Afinidad*, 63 (525), 362-369.

Jiménez, L., Pérez, A., de la Torre, M.J., Moral, A., Serrano, L., 2007a. Characterization of vine shoots, cotton stalks, *Leucaena leucocephala* and *Chamaecytisus proliferus*, and of their ethyleneglycol pulps. *Bioresource Technology*, 98 (18), 3487-3490.

Jiménez, L., Pérez, A., Moral, A., Serrano, L., Angulo, V., 2007b. Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Residues from Pulping Processes as a Method of Obtaining Sugar for the Production of Ethanol. *Afinidad*, 64(531), 574-580.

Jiménez, L., Angulo, V., Serrano, L., Moral, A., Rodríguez, A., 2008a. Almacenamiento de materias primas para pastas celulósicas. *Ingeniería Química*, 458, 154-159.

Jiménez, L., Rodríguez, A., Pérez, A., Moral, A., Serrano, L., 2008b. Alternative raw materials and pulping process using clean technologies. *Industrial Crops and Products*, 28 (1), 11-16.

Jiménez, L., Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., 2008c. Organosolv ethanolamine pulping of olive wood: Influence of the process variables on the strength properties. *Biochemical Engineering Journal*, 39 (2), 230-235.

Johnson, M., Shivkumar, S., Berlowitz-Tarrant, L., 1996. Structure and properties of filamentous green algae. *Materials Science and Engineering B*, 38 (1-2), 103-108.

Johnson, M., Shivkumar, S., 2004. Filamentous green algae additions to isocyanate based foams. *Journal of Applied Polymer Science*, 93 (5), 2469-2477.

Jonoobi, M., Mathew, A.P., Oksman, K., 2012. Producing low-cost cellulose nanofiber from sludge as new source of raw materials. *Industrial Crops and Products*, 40 (1), 232-238.

Kiran, E., Teksoy, I., Guven, K.C., Guler, E., Guner, H., 1980. Studies on seaweeds for paper production. *Bot. Mar.*, 23, 205–207.

Li, J., Wei, X., Wang, Q., Chen, J., Chang, G., Kong, L., Su, J., Liu, Y., 2012. Homogeneous isolation of nanocellulose from sugarcane bagasse by high pressure homogenization. *Carbohydrate Polymers*, 90 (4), 1609-1613.

López-Simeon, R., Beltrán Conde, H., Campos-Terán, J., Hernández-Guerrero, M., 2011. Extracción y caracterización interfacial de celulosas extraídas de desechos residuales de la industria del agar, para su posible uso en la formación de membranas mesoporosas con ordenamiento hexagonal. OVII-03. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 19 a 20 de Junio, 2011.

Makooi, M., Reynolds, J.T., Johansen, H.W., 1976. Effects of glucose and light on cellulose content of *Chlorella pyrenoidosa*. *Phytochemistry*, 15 (3), 367-369.

Mihranyan, A., Llagostera, A.P., Karmhag, R., Strømme, M., Ek, R., 2004a. Moisture sorption by cellulose powders of varying crystallinity. *International Journal of Pharmaceutics*, 269 (2), 433-442.

Mihranyan, A., Strømme M., 2004b. Capillary condensation of moisture in fractal pores of native cellulose powders *Chemical Physics Letters*, 393, 389–392.

Mihranyan A., Edsman K., Strømme M., 2007. Rheological properties of cellulose hydrogels prepared from *Cladophora* cellulose powder. *Food Hydrocolloids*, 21 (2), 267-272.

Mitsuo, Y., Eisuke, Y., 1996a. (to Mitsubishi Paper Mills). *Jpn. Pat.* 08-229318.

Mitsuo, Y., Eisuke, Y., 1996b. (to Mitsubishi Paper Mills). *Jpn. Pat.* 08-229317.

Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J., 2011. Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40 (7), 3941-3994.

Moral, A., Monte, M.C., Cabeza, E., Blanco, A., 2010. Morphological characterization of pulps to control paper properties. *Cellulose and Chemistry technology*, 44, 473-480

Moral, A., Hernández, M.D., Tijero, A., González, Z., García, J., de la Torre, M.J., 2012. NIRS determination of carbohydrates from hydrothermal treated rice straw. *TAPPI Journal*, 11 (4), 27-32.

Northcote, D.H., Goulding, K.J., Horne, R.W., 1958. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *The Biochemical journal*, 70 (3), 391-397.

Percival, E. G. V., Ross, A. G., 1949. Marine algal cellulose. *Journ. Chem. Soc.* 3041-3043.

Pérez, I., de la Torre, M.J., Jiménez, L., 2005. Pasteados kraft y al sulfito. Libro: Fabricación de pastas celulósicas para papel a partir de materias primas alternativas a las convencionales, capítulo 8, 174-203

Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., Jiménez L., 2008a. Pulping of rice straw with high-boiling point organosolv solvents. *Biochemical Engineering Journal*, 42 (3), 243-247.

Rodríguez, A., Serrano, L., Moral, A., Pérez, A., Jiménez L., 2008b. Use of high-boiling point organic solvents for pulping oil palm empty fruit bunches. *Bioresource Technology*, 99 (6), 1743-1749.

Rodríguez, A., Moral, A., Serrano, L., Labidi, J., Jiménez, L., 2008c. Rice straw pulp obtained by using various methods. *Bioresource Technology*, 99 (8), 2881-2886.

Rodríguez, A., Moral, A., Serrano, L., Jiménez L., 2009a. Residuos de la industria del aceite de palma como materia prima alternativa para la fabricación de papel. *Ingeniería Química*, 468, 58-65.

Rodríguez, A., Moral, A., Sánchez, R., Jiménez, L., 2009b. Use of diethanolamine to obtain cellulose pulps from solid fraction of hydrothermal treatment of rice straw. *Afinidad*, 66 (539), 20-26.

Rodríguez, A., Moral, A., Sánchez, R., Requejo, A., Jiménez, L., 2009c. Influence of variables in the hydrothermal treatment of rice straw on the composition of the resulting fractions. *Bioresource Technology*, 100 (20), 4863-4866.

Sakai, M., Seto, T., Kanaeko, M., Hada, M. Kinomoto, K., 1996. Method for producing pulp from green algae. Patent number: 5500086. Filing date: 30 Apr. Issue date: 19 Mar (1996).

Tijero, A., Monte, M.C., Blanco, A., Negro, C., Tijero, J., 2009. Pitch adsorption in natural and modified talcs. *Journal of pulp and paper science*, 35 (3-4), 130-136.

Tijero, A., Monte, M.C., Blanco, A., 2011. Pitch detackification with natural and modified talcs () *TAPPI Journal*, 10 (10), 53-59.

Tijero, A., Monte, M.C., Tijero, J., Moral, A., Pérez, I., de la Torre, M.J., 2012. Procedimiento para la cocción kraft de material lignocelulósico con lejías alcalinas de baja sulfidez en la fabricación de pasta con incorporación directa al digestor de la sal disódica del dihidroxiantraceno. Patente PTC/2012/000161.

Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas R., Corleti, V., 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements *Bioresource Technology*, 98 (2), 296–301.

Villar, J.C., Jiménez, L., 2005. Pasteado mecánico. Libro: Fabricación de pastas celulósicas para papel a partir de materias primas alternativas a las convencionales, capítulo 6, 124-149.

Yang, L., Zhang, H.-Y., Yang, Q., Lu, D.-N., 2012. Bacterial cellulose-poly (vinyl alcohol) nanocomposite hydrogels prepared by chemical crosslinking. *Journal of Applied Polymer Science*, 126 (SUPPL. 1), E244-E250.

You, H.C., Park, J.H., 2009. Pulp and paper made from Rhodophyta and manufacturing method thereof. Patent number: 7622019. Filing date: Nov 12, 2004. Issue date: Nov 24, 2009. Application number: 10/578,281.