



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Análisis de la capacidad antioxidante de los extractos de microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* obtenidos de biomasa fresca vs liofilizada”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímica Farmacéutica

Autora:

Diana Patricia León Domínguez.

CI: 0302454376

Correo electrónico: dipaledo@gmail.com

Tutor:

Dr. Fabián León Tamariz. PhD.

CI: 0102311610

Asesora:

BQF. Jéssica Priscila Calle López, Mgt.

CI: 0102838497

Cuenca - Ecuador.

04 – Abril - 2022.



RESUMEN

Las microalgas se han convertido en organismos de sumo interés en varias ramas de la ciencia. Esto se debe principalmente a la diversidad de compuestos que producen y a la facilidad de su cultivo. Dentro de los componentes reportados se encuentran los antioxidantes, moléculas importantes para prevenir y controlar el estrés oxidativo, causante de varias enfermedades crónicas y del envejecimiento orgánico. En este trabajo de titulación se evaluó la capacidad antioxidante de dos especies de microalgas: *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapaloshipon sp.* Para ello, se emplearon las técnicas DPPH, FRAP y ABTS, y, se midió la concentración de polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Dicho análisis se llevó a cabo en extractos metanólico y metanol-agua 50:50 %, v/v, partiendo tanto de biomasa fresca como liofilizada de cada una de las especies. Se encontró que no existe un solvente o estado que permita la mayor cantidad de extracción de antioxidantes de manera universal, sino que, es variable según la especie. Esto es debido a importantes diferencias en su estructura y composición de la pared celular. Así, para *Nannochloropsis oculata* el mejor resultado extractivo de antioxidantes se evidenció en biomasa liofilizada con metanol 100 % como solvente, mientras que para *Hapaloshipon sp.* el mejor resultado se obtuvo con biomasa fresca y metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente de extracción. La mayor cantidad de polifenoles se encontró en el extracto de *Hapaloshipon sp.* fresca con metanol 100 %.

Palabras claves: Microalgas. *Nannochloropsis oculata*. *Hapaloshipon sp.*
Capacidad antioxidante. Polifenoles totales.



ABSTRACT

Microalgae have become organisms of interest in several science fields due to the diversity of components they produce, and the facility for their harvesting. Antioxidants are among the molecules present in microalgae. They are able to prevent and control oxidative stress, which is the cause of several chronic illnesses and aging. In this work, two microalgae species were analyzed in order to evaluate their antioxidant capacity: *Nannochloropsis oculata*, and possible *Hapaloshipon sp.* The techniques used for quantifying the antioxidant capacity were DPPH, FRAP & ABTS; also, the total phenolic content was measured following the Folin-Ciocalteu method. The analysis were performed in methanolic and methanol-water 50:50 %, v/v extracts of both species, each one of them obtained from fresh and lyophilized biomass. The results show that there is not a solvent or condition that allows the most efficient antioxidant extraction, but that it depends on the microalgae species. This is due to important differences between each one's structure and cell wall composition. For *Nannochloropsis oculata*, the best results regarding antioxidants extraction were obtained from lyophilized biomass using methanol 100 % as solvent. In contrast, for *Hapalosiphon sp.* the best antioxidant extraction was found to be from fresh biomass using methanol-water 50:50 %, v/v as solvent. As for the total phenolic content, *Hapalosiphon sp.* fresh with methanol 100 % as solvent was the one that showed the higher amount of phenols.

Keywords: Microalgae. *Nannochloropsis oculata*. *Hapalosiphon sp.* Antioxidant capacity. Total phenolic content.



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
DEDICATORIA	11
AGRADECIMIENTO	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos	14
Hipótesis	14
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Descripción general de microalgas y cianobacterias	15
1.2 Especies de interés en este estudio	16
1.2.1 <i>Hapalosiphon sp.</i>	16
1.2.2 <i>Nannochloropsis oculata</i>	17
1.3 Antioxidantes	18
1.3.1 Antioxidantes en microalgas.....	19
1.4 Técnicas de extracción	20
1.4.1 Micronización	21
1.4.2 Ultrasonido.....	21
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1 Materiales y reactivos	22
2.2 Métodos.....	22
2.2.1 Cultivo de microalgas.....	22
2.2.2 Obtención de biomasa.....	22
2.2.3 Liofilización de biomasa	23
2.2.4 Extracción mediante micronización	23
2.2.5 Extracción mediante ultrasonido	24
2.2.6 Preparación de extractos	25
2.2.7 Elaboración de placas TLC.....	25
2.2.8 Pruebas de capacidad antioxidante	27



2.2.8.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	27
2.2.8.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	27
2.2.8.3 ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)	28
2.2.8.4 Polifenoles totales - Método de Folin Ciocalteu	29
2.2.9 Análisis estadístico	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
3.1 Placas TLC	31
3.1.1 Antioxidantes.....	31
3.1.2 Flavonoides	33
3.1.3 Terpenoides.....	35
3.2 Capacidad antioxidante	36
3.2.1 Curvas de calibración	36
3.2.2 Resultados de las muestras.....	38
3.3 Análisis estadístico	40
3.3.1 DPPH.....	40
3.3.2 FRAP	41
3.3.3 ABTS	43
3.3.4 Polifenoles totales	44
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
4.1 Conclusiones	49
4.2 Recomendaciones	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	56



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hapalosiphon sp.</i>	16
Figura 2. <i>Nannochloropsis oculata</i>	18
Figura 3. Antioxidantes de los extractos en placa TLC a $\lambda = 366$ nm.....	32
Figura 4. Antioxidantes de los extractos en placa TLC en luz visible.	33
Figura 5. Flavonoides de los extractos en placa TLC a $\lambda = 366$ nm.....	34
Figura 6. Terpenoides de los extractos en placa TLC en luz visible.....	36
Figura 7. Curva de calibración de la técnica DPPH.....	37
Figura 8. Curva de calibración de la técnica FRAP.	37
Figura 9. Curva de calibración de la técnica ABTS.....	38
Figura 10. Curva de calibración de la técnica Polifenoles Totales.....	38
Figura 11. Análisis de varianza de las muestras para la técnica DPPH.	41
Figura 12. Análisis de varianza de las muestras para la técnica FRAP.....	42
Figura 13. Análisis de varianza de las muestras para la técnica ABTS.....	44
Figura 14. Análisis de varianza de las muestras para la técnica Polifenoles Totales.....	45



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de las muestras a analizar.	26
Tabla 2. Fases móviles y reveladores para las placas TLC.....	26
Tabla 3. Promedios de los resultados obtenidos del análisis de la capacidad antioxidante.	39



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo WC.....	56
Anexo 2. Resultados de las concentraciones de cada muestra para cada ensayo (DPPH, FRAP, ABTS y Polifenoles Totales).....	57
Anexo 3. Resultados del análisis estadístico del ensayo DPPH obtenido en Infostat ®	62
Anexo 4. Resultados del análisis estadístico del ensayo FRAP obtenido en Infostat ®	64
Anexo 5. Resultados del análisis estadístico del ensayo ABTS obtenido en Infostat ®	66
Anexo 6. Resultados del análisis estadístico del ensayo Polifenoles Totales obtenido en Infostat ®.....	69



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Diana Patricia León Domínguez en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Análisis de la capacidad antioxidante de los extractos de microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* obtenidos de biomasa fresca vs liofilizada”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de abril de 2022

Diana Patricia León Domínguez

C.I: 0302454376



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Diana Patricia León Domínguez, autora del trabajo de titulación “Análisis de la capacidad antioxidante de los extractos de microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* obtenidos de biomasa fresca vs liofilizada”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de abril de 2022

Diana Patricia León Domínguez

C.I: 0302454376



DEDICATORIA

A mis padres, por haber sido mi apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mis hermanos: Cristina, Juan y Catalina, por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles y ser siempre mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinas, por iluminar mi vida con su presencia.



AGRADECIMIENTO

A mis padres, por haberme apoyado siempre en mis decisiones y darme la posibilidad de formarme profesionalmente.

A mi tutor, Dr. Fabián León, por haber sido un gran maestro y un excelente modelo a seguir.

A mis asesores, BQF. Jéssica Calle e Ing. David Vanegas, por haberme ayudado y guiado durante el proceso de elaboración de este trabajo de titulación.

A todo el personal del Departamento de Biociencias, sin su apoyo constante, este trabajo no hubiese sido posible.

A mis amigos, quienes estuvieron desde el inicio de mi formación académica y quienes llegaron casi al final, por convertirse en mi segunda familia y estar conmigo en los momentos buenos y malos.

A todos mis maestros, por compartirme sus conocimientos y ayudarme en mi formación profesional y personal.

A la Universidad de Cuenca, mi Alma Máter, por darme la oportunidad de formarme bajo criterios de excelencia y permitirme alcanzar mis objetivos.

A todos quienes estuvieron conmigo durante este proceso educativo, su presencia significó mucho para mí.



INTRODUCCIÓN

Se estima que existen aproximadamente 50.000 especies de microalgas en el mundo; sin embargo, sólo se ha estudiado alrededor de 2/3 de éstas (Geada, Vasconcelos, Vicente, & Fernandes, 2017). A lo largo de los años se ha evidenciado un incremento exponencial en el estudio de las microalgas debido a su interés en áreas como la nutracéutica, farmacia, cosmetología y energías renovables, pero aún existe un largo camino por recorrer en cuanto al análisis de estos organismos (Khan, Shin, & Kim, 2018).

Las microalgas son fuente de varios compuestos químicos, que varían según el aporte de nutrientes proporcionados durante su cultivo, de la especie analizada y del tipo de cultivo realizado. No obstante, de manera general se ha encontrado que principalmente poseen proteínas, polisacáridos, micro y macrominerales, vitaminas, compuestos antioxidantes y en algunos casos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como omega-3 y DHA (Valenzuela, Sanhueza, & Valenzuela, 2015). Es importante destacar que algunos de los compuestos bioactivos obtenidos de las microalgas han demostrado tener otros potenciales farmacológicos como actividad anticancerígena, inmuno-estimuladora, antiinflamatoria e hipocolesterolémica (Coêlho et al., 2019).

Las microalgas han desarrollado además un poderoso mecanismo de defensa frente a los radicales libres (ROS) mediante la producción de moléculas antioxidantes, las cuales son de gran interés, especialmente en la industria farmacéutica y alimenticia (Coêlho et al., 2019). A pesar de que en la actualidad existen antioxidantes de origen natural empleados en dichas industrias, los más usados siguen siendo sintéticos, y se ha reportado que varios de estos son potencialmente carcinogénicos (Ugya et al., 2021). Afortunadamente, las microalgas unicelulares han figurado como fuente potencial alternativa de estos compuestos (Goiris et al., 2012). Esto se debe a su capacidad de producir metabolitos tales como polifenoles, carotenoides y esteroides, conocidos por su capacidad antioxidante. De esto se deduce la importancia de su obtención y análisis,



pues se sabe que su consumo protege al organismo de los radicales libres, por ende, de algunas patologías crónicas asociadas a su acumulación, como problemas cardiovasculares y cáncer (Sansone & Brunet, 2019). Es importante además recalcar las ventajas que representan las microalgas en cuanto a la obtención de productos de interés, como su crecimiento rápido, contenido de metabolitos en relación a la biomasa cultivada, bajo costo de cultivo y producción, gran tolerancia a contaminantes y capacidad de crecer en ambientes extremos (Coêlho et al., 2019).

Mediante este trabajo de titulación se evaluó la actividad antioxidante en extractos de la microalga *Nannochloropsis oculata*, y la cianobacteria, posible *Hapaloshipon sp.*, como variable respuesta, y como línea de partida las condiciones extractivas y de cultivo optimizadas para estos microorganismos.

Objetivo general

Analizar el potencial antioxidante de los extractos de biomasa fresca y liofilizada de las microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* mediante los métodos DPPH, FRAP, ABTS y Folin Ciocalteu.

Objetivos específicos

- Comparar de manera cualitativa los posibles metabolitos antioxidantes presentes en extractos metanólicos e hidroalcohólicos (metanol-agua 50:50 %, v/v) obtenidos a partir de biomásas de microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* mediante TLC.
- Contrastar el estado de conservación de los posibles elementos antioxidantes presentes en la biomasa de microalgas tras la liofilización o extracción en fresco.

Hipótesis

Existen diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad antioxidante



de las microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.*

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Descripción general de microalgas y cianobacterias

Las **microalgas** son organismos autótrofos y acuáticos pertenecientes al reino Protista que poseen clorofila, por lo cual son capaces de realizar el proceso de fotosíntesis (Randrianarison & Ashraf, 2017). Pueden ser eucariotas o procariotas; y, a pesar de que estos últimos se denominan **cianobacterias**, el término *microalgas* comúnmente se emplea para referirse a ambos grupos (Corrêa et al., 2020).

Las microalgas son los organismos responsables de aproximadamente el 40 % de la fijación global de carbono y la consecuente producción de oxígeno (Friedl et al., 2012). Es por ello que se han planteado como especies de interés para disminuir el efecto invernadero, pues además presentan una elevada velocidad fotosintética y de crecimiento (Klinthong et al., 2015).

Las microalgas son capaces de producir una gran variedad de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas; entre ellas, antiinflamatoria, antioxidante e incluso antiproliferativa, la cual se encuentra todavía en estudio (Singh et al., 2017). A pesar de que son organismos que se encuentran muy poco estudiados aún, algunas especies se han posicionado ya como la fuente principal de ciertos compuestos químicos de interés, como los antioxidantes. Es así que se comercializa la astaxantina producida por el género *Haematococcus*, y la fucoxantina obtenida de las Diatomeas (Fu et al., 2017).

Su importancia y versatilidad de cultivo radica en que pueden desarrollarse en diversas fuentes de agua (salina, fresca, etc.), emplean CO₂ como nutriente y no necesitan de suelo para su desarrollo, lo cual representa una ventaja en contraste con las plantas (Randrianarison & Ashraf, 2017). También es importante destacar su capacidad para tolerar amplios rangos de temperatura, pH e intensidades

lumínicas (Khan et al., 2018).

1.2 Especies de interés en este estudio

1.2.1 *Hapalosiphon* sp.

Hapalosiphon es un género de cianobacterias pertenecientes a la familia *Hapalosiphonaceae*. Su morfología es variada, pero sus células generalmente son alargadas, de aproximadamente 200 μm de longitud y se encuentran dispuestas a manera de ramificaciones (Núñez et al., 2013) como se observa en la **Figura 1**. Son microorganismos gram negativos capaces de fijar el nitrógeno, que pueden encontrarse sujetos a un sustrato (acuoso o terrestre) o flotando libremente en el agua (Tan et al., 2016). Han demostrado un importante efecto inmunomodulador *in vitro* en cultivos celulares humanos. Así, se observó que los extractos de *Hapalosiphon* sp. son capaces de reducir la proliferación de células T y disminuir la apoptosis y necrosis celular (Chilczuk et al., 2019). Los metabolitos biológicamente activos conocidos de este género de cianobacterias son los denominados *hapalindoles*, un grupo de alcaloides del tipo indólicos que, en estudios farmacológicos, lograron evidenciar un efecto antibacterial, antimicótico, e incluso insecticida (Nandagopal et al., 2021).



Figura 1. *Hapalosiphon* sp. Fuente: Autora.



1.2.2 *Nannochloropsis oculata*

Es una microalga perteneciente a la familia *Monodopsidaceae*, unicelular, eucariota y de crecimiento rápido. Sus células tienen forma esférica o ligeramente ovalada con un diámetro de 2 a 4 μm ; además, contienen cloroplastos parietales de coloración amarilla verdosa, así se presenta su estructura en la **Figura 2** (Zakariah et al., 2016). Posee únicamente clorofila a y su pigmento principal es la violaxantina. Su pared celular está compuesta por una parte fibrilar, esencialmente de celulosa, y una parte de un componente amorfo constituido por lípidos, proteínas, carbohidratos y en menor proporción, carbonato de calcio y sílice (Sukarni et al., 2014).

Una evaluación nutricional de *Nannochloropsis oculata* demostró que posee gran cantidad de proteínas, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y compuestos antioxidantes tales como el β caroteno y ácido ascórbico; por lo cual su interés como suplemento alimenticio ha incrementado (Kagan & Matullka, 2015). También es una fuente de pigmentos de uso industrial tales como la astaxantina y la cantaxantina. A pesar de ello, su principal interés industrial se relaciona con su contenido lipídico, pues se ha demostrado que esta microalga tiene la capacidad de convertir hasta un 60 % de su biomasa en lípidos (Sánchez, 2021).

Nannochloropsis oculata se encuentra constituida en un 56.9 % de proteínas (en peso seco), mientras que su contenido de lípidos es de un 21.6 %. Debido a ello, esta microalga está siendo estudiada como potencial alimento en la acuicultura (Amouzad et al., 2019).

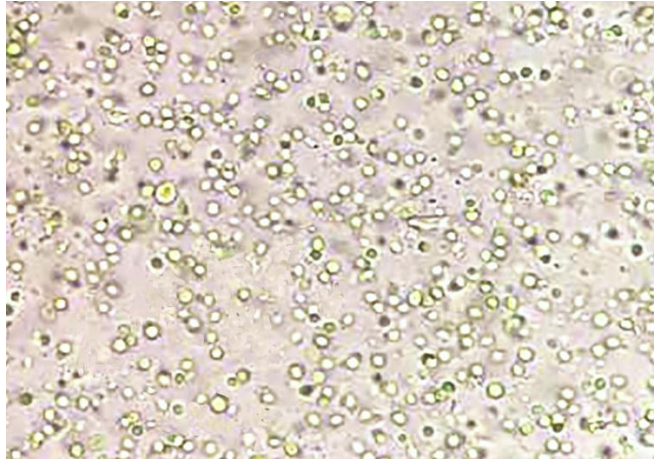


Figura 2. *Nannochloropsis oculata*. Fuente: Autora.

1.3 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas capaces de evitar y revertir el daño oxidativo generado por los radicales libres. Existen diversos compuestos con dicha capacidad, entre los cuales se encuentran algunas vitaminas, carotenoides y polifenoles, como los flavonoides (Sansone & Brunet, 2019). Los compuestos fenólicos han sido descritos como los responsables primarios de la capacidad antioxidante; mientras que otros como los carotenoides, aunque contribuyen al efecto antioxidante, no es su principal función (Banskota et al., 2018).

Los antioxidantes actúan mediante diversos mecanismos como la transferencia de electrones, transferencia de átomos de hidrógeno y la capacidad de quelar metales (Santos et al., 2019). Sin embargo, de manera general, dichos mecanismos se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos según si emplean enzimas o no para realizar su acción (Ugya et al., 2021).

Los sistemas enzimáticos comprenden la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y ascorbato peroxidasa. La SOD es la encargada de catalizar la conversión de O_2 a H_2O_2 , producto que es posteriormente reducido a $H_2O + O_2$ gracias a la catalasa o a la glutatión peroxidasa (Santos et al., 2019). La SOD es una metaloenzima que necesita de la presencia de un metal como cofactor para ejercer su acción; dependiendo del mismo, se tendrán 2 diferentes tipos



(familias) de esta enzima: cobre-zinc superóxido dismutasas (Cu/Zn-SOD), y hierro-manganeso superóxido dismutasas (Fe/MnSOD) (Castillo & Riverón, 2014). Por su parte, la catalasa requiere de manganeso o hierro para poder catalizar el desdoblamiento del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La glutatión peroxidasa es una enzima dependiente del selenio, que desempeña un rol fundamental en la inhibición de la peroxidación lipídica (Santos et al., 2019).

Los antioxidantes no enzimáticos son moléculas hidro o liposolubles que al interactuar con el radical libre, se convierten momentáneamente también en un radical libre, pero menos reactivo y fácilmente neutralizable. Este tipo de antioxidantes posee además la capacidad de transportar los radicales libres a sitios donde su efecto puede ser menos perjudicial (Mariaca et al., 2016).

1.3.1 Antioxidantes en microalgas

La concentración de antioxidantes varía según la especie de microalga. No obstante, ciertas clases de microalgas, tales como *Eustigmatophyceae* poseen capacidad antioxidante semejante a varias plantas y frutas, como *Rubus sp.* (Sansone & Brunet, 2019). Algunas microalgas y cianobacterias han demostrado ser capaces de producir antioxidantes tales como los flavonoides, los cuales anteriormente se consideraban exclusivos de las plantas terrestres (Batista et al., 2017).

Se ha evidenciado que las microalgas pueden incrementar su producción de antioxidantes bajo ciertas condiciones que ocasionan estrés en el organismo (Faraloni & Torzillo, 2017). Así, a pesar de que existe una variación significativa dependiendo de la especie de microalga y de la condición causante del estrés, se ha reportado que la síntesis de antioxidantes incrementa con la exposición prolongada a la radiación UV, exposición a metales y déficit de nutrientes (Gauthier et al., 2020).

Son varios los compuestos responsables de la capacidad antioxidante en un organismo, pero se ha descrito que, para las microalgas, los carotenoides y



polifenoles son los de mayor importancia, seguidos de los ácidos grasos poliinsaturados (Rahman et al., 2020). Otros autores describen también la importancia del ácido ascórbico, tocoferoles, y clorofilas, además de los mencionados anteriormente (López et al., 2020). Por ello, es importante enfatizar en la variación de actividad y compuestos antioxidantes según la especie, y condiciones de cultivo.

En la actualidad, las algas son consideradas como una fuente importante de compuestos fenólicos, y, a pesar de que las microalgas se encuentran menos estudiadas que las algas macroscópicas, las especies analizadas hasta ahora han demostrado tener un elevado contenido de estos compuestos (Del Mondo et al., 2021). Además, un estudio realizado por Jerez et al. (2017) encontró que los compuestos fenólicos son más abundantes en microalgas que en las cianobacterias.

Es importante destacar que las microalgas poseen ciertos antioxidantes propios y característicos que no se han encontrado en otras especies. Este es el caso de algunos carotenoides tales como la fucoxantina, diadinoxantina, sifoxantina, y de algunos pigmentos como las ficobiliproteínas (Sansone & Brunet, 2019).

1.4 Técnicas de extracción

Debido a que la mayoría de los componentes de las microalgas se encuentran dentro de los organelos o dispersos en el citoplasma celular, la necesidad de romper la rígida pared celular para obtenerlos es evidente (Lam, 2017). Las células eucariotas de las microalgas son más resistentes a los daños físicos y químicos que las procariontas, por lo que la ruptura celular representa en sí un reto (Lee et al., 2017).

Los métodos de ruptura celular se pueden clasificar en mecánicos y no mecánicos. Los primeros se caracterizan por requerir un importante aporte energético, y su principal desventaja es que la elevada presión o temperatura generada en el proceso puede ocasionar daños o pérdidas de ciertos compuestos presentes en la



matriz celular. Por su parte, los métodos no mecánicos son aquellos que se fundamentan en el uso de sustancias químicas o biológicas (enzimas) que, al interactuar directamente con la pared celular de la microalga, permiten su degradación parcial y la salida de los componentes internos (Lee et al., 2017).

1.4.1 Micronización

La micronización es un proceso físico en el cual una partícula o célula se rompe debido a una acción mecánica. Al romperse, los fragmentos celulares obtenidos son de menor tamaño, por lo que la superficie de contacto aumenta, lo cual a su vez facilita su extracción (Bender et al., 2019). Esta técnica emplea unas pequeñas esferas, generalmente de vidrio o circonio, que al colisionar con las células con las que está en contacto, ocasiona su ruptura (Corrêa et al., 2020).

La micronización ha demostrado una importante eficiencia, es rápido, de bajo costo y permite un fácil control de temperatura, motivos por los cuales se ha posicionado como un método con gran aceptación y aplicabilidad (Günerken et al., 2015).

1.4.2 Ultrasonido

La extracción por ultrasonido es una técnica que emplea ondas vibratorias elásticas mecánicas capaces de viajar a través de un medio líquido (Cheersonic, 2014). El principio extractivo se basa en el fenómeno de cavitación, el cual describe el proceso en el cual las ondas ultrasónicas han creado burbujas en el medio (solvente), que luego implosionan en la superficie sólida (células) (Chemat et al., 2016). Dicha implosión, a su vez, ocasiona que se rompa la estructura celular y que se creen poros en la membrana celular (sonoporación), permitiendo que los componentes intracelulares salgan (Corrêa et al., 2020).

La extracción ultrasónica o sonicación representa un método fácil, rápido y de alto rendimiento extractivo que se puede aplicar en diferentes materias primas (Chema et al., 2016).



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y reactivos

El acetato de etilo grado análisis, ácido acético glacial 100 %, acetato de sodio para análisis, ácido clorhídrico fumante 37 %, ácido sulfúrico 96 %, carbonato de sodio para análisis, cloroformo para análisis, dioxano para análisis, metanol grado análisis, revelador de productos naturales (PEG 4000 5 % en etanol), reactivo de Folin y tolueno para análisis se obtuvieron de Merck® (Darmstad, Alemania).

El ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), ácido gálico anhidro para síntesis >98 %, radical 2,2, Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), radical 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 98 % y el antioxidante de referencia TROLOX (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico 97 %) se adquirieron de Sigma-Aldrich® (Darmstad, Alemania).

El anisaldehído y persulfato de potasio fueron provistos por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. El etanol absoluto para análisis se adquirió de J. T Baker® (Pensilvania, Estados Unidos).

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo de microalgas

Las especies *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* fueron cultivadas en medio WC, cuya preparación se describe en el **Anexo 1**. Los microorganismos fueron sembrados en envases de vidrio estériles de 2 litros de capacidad, herméticamente cerrados y mantenidos a una temperatura de 30 °C, con ciclos de luz – oscuridad 12 - 12 y línea de aire constante (Universidad de Cuenca, 2019).

2.2.2 Obtención de biomasa

Una vez transcurrido el tiempo óptimo de crecimiento bajo las condiciones provistas (aproximadamente de 2 a 4 semanas), se procedió con la obtención o recolección de biomasa. Esto se logró mediante centrifugación a una velocidad de 3000 rpm



(972 RCF) y un tiempo de 5 minutos empleando una centrífuga 2-6 de Sigma ® (Darmstad, Alemania). Los tubos se llenaron hasta un 80 % de su capacidad. Después de que se centrifugó toda la biomasa con el medio de cultivo, se llevaron a cabo tres etapas de lavado, en las cuales el remanente en el tubo se cubrió con agua destilada en igual cantidad en la que estuvo anteriormente medio de cultivo, y se repitió el proceso con el objetivo de eliminar los componentes residuales del medio. Al terminar los tres ciclos de lavado, la biomasa presente al fondo de los tubos se recolectó con ayuda de una pipeta estéril y transfirió a un tubo Falcon debidamente etiquetado (Universidad de Cuenca, 2019).

2.2.3 Liofilización de biomasa

Para la liofilización de la biomasa se empleó el equipo liofilizador FreeZone 2.5 de LABCONCO ® (Kansas, Estados Unidos). La liofilización es un proceso en el cual el agua presente en la estructura es sublimada gracias al empleo de vacío y un ligero incremento de temperatura. Es por ello que antes de colocar la muestra en el equipo, esta debe estar debidamente congelada por lo menos durante tres horas; este proceso se realizó en un Biofreezer Fisher Scientific ® R134A (Massachusetts, Estados Unidos) a -80 °C. Se rotó el tubo cada cierto tiempo para conseguir una capa de biomasa homogénea en la pared del mismo. Se procedió a liofilizar la muestra por 24 horas. Las muestras fueron pesadas y almacenadas a -20 °C (Universidad de Cuenca, 2019).

2.2.4 Extracción mediante micronización

La ruptura celular de las microalgas se realizó mediante la técnica de micronización, para lo cual se empleó un equipo micronizador Bead Beater de BIOSPEC ® (Shanghái, China) el cual consta de un rotor, un contenedor y una pieza denominada Ice-water jacket. El procedimiento se llevó a cabo colocando beads de vidrio de 0.2 µm de diámetro, junto con la biomasa fresca o liofilizada respectivamente, y el solvente a emplearse en la extracción (metanol o mezcla metanol/agua) en el contenedor. Luego, este se adaptó al Ice-water jacket y a su vez al rotor. El dispositivo Ice-water jacket se debe llenar de agua fría con hielos para control de la



temperatura (Universidad de Cuenca, 2019).

Para las extracciones, se emplearon 3 mL de solvente por gramo de biomasa. En este estudio se realizaron 2 ciclos de micronización, cada uno consistente en 1 minuto de ruptura (rotor encendido) y 1 minuto de descanso (rotor apagado para evitar un incremento de temperatura) repetido 3 veces, con una duración total de 5 minutos; hubo un intervalo de 5 minutos entre ciclo y ciclo. Una vez culminado el proceso, se dejó reposar durante media hora el contenedor con la biomasa y las beads para decantación, que facilite la separación de los componentes. Posteriormente, se procedió con la filtración de la suspensión, con ayuda de una malla previamente esterilizada. Así, se separó la biomasa micronizada de las beads, las cuales se lavaron con agua destilada, para luego volver a filtrarse (Universidad de Cuenca, 2019).

El extracto obtenido se almacenó nuevamente a -20 °C hasta su análisis.

2.2.5 Extracción mediante ultrasonido

El siguiente proceso extractivo empleado fue el de sonicación. Tanto las biombras frescas como las liofilizadas de cada microalga se colocaron en balones de 250 mL con el solvente a emplear (metanol 100 % y metanol-agua 50:50 %, v/v) con una relación de 60 mL por cada 2 g de biomasa (Universidad de Cuenca, 2019).

Para ambas extracciones, el procedimiento experimental fue el mismo. Este consiste en someter a la muestra a 3 ciclos de sonicación, para lo cual se empleó el equipo ultrasonido 8893 de Cole-Parmer® (Illinois, Estados Unidos). Cada ciclo tuvo una duración de 5 horas. Se controló que la temperatura del Baño ultrasónico no supere los 36 °C para evitar la pérdida de componentes de interés (Universidad de Cuenca, 2019).

Después de cada ciclo se filtró la biomasa a través de gasa estéril. El filtrado se colectó en otro balón y se continuó con el siguiente ciclo de sonicación, hasta completar 3 ciclos.



2.2.6 Preparación de extractos

Los extractos obtenidos se colectaron en balones de vidrio. Para concentrarlos se utilizó un equipo Rotavapor Laborota 4000 Efficient de Heidolph® (Schwabach, Alemania) con un baño a temperatura de 30 °C, y una rotación de 80 giros/min. Posteriormente, los balones que contienen el extracto concentrado se lavaron con agua destilada y colectaron en tubos para liofilizar. Estos se congelaron en el Biofreezer a -80 °C, y se liofilizaron por 24 horas, luego de lo cual el extracto se pesó y distribuyó en viales (Universidad de Cuenca, 2019).

La redilución se realizó añadiendo metanol a los extractos liofilizados previamente pesados hasta alcanzar una concentración de 5 mg/mL. Los viales se agitaron con ayuda del vortex, y fueron sometidos a sonicación durante una hora, controlando que la temperatura sea inferior a 36 °C. Se evidenció que los extractos no se disolvían completamente, por lo que se optó por realizar un nuevo filtrado. Este paso se llevó a cabo transfiriendo los extractos a una jeringa, y pasándolos por un filtro de 0.42 µm. Una vez que se filtró todo el extracto, se realizaron dos lavados del filtro con metanol grado análisis, en cada uno se empleó 1 mL del mismo solvente. El filtrado se recolectó en tubos de vidrio (Universidad de Cuenca, 2019).

Nuevamente se realizó la concentración de extractos, para lo cual se utilizó un concentrador a vacío RapidVap de LABCONCO® (Kansas, Estados Unidos) con una temperatura de 29-32 °C y 70 rpm, durante 3 horas. Los extractos secos y concentrados se pesaron y se redisolviaron empleando metanol grado análisis, para llegar a una concentración de 5 mg/mL. Se homogenizó con ayuda del vortex (Universidad de Cuenca, 2019).

2.2.7 Elaboración de placas TLC

Se emplearon placas TLC de sílica gel 60 F254 - soporte de vidrio de Merck® (Darmstad, Alemania), las cuales fueron previamente activadas a 100 °C durante una hora. Transcurrido este tiempo se realizó la siembra de las muestras a 1 cm de distancia entre sí (Universidad de Cuenca, 2018). Para todas las placas TLC se

realizó el mismo orden de siembra, con las identificaciones detalladas en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Identificación de las muestras a analizar.

Código de identificación	Especie de microalga	Condición de la biomasa	Solvente de extracción
1A1	<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	Metanol 100 %
2A2	<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	Metanol 100 %
3A3	<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	Metanol-Agua 50:50 %, v/v
4A4	<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	Metanol-Agua 50:50 %, v/v
1B1	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	Metanol 100 %
2B2	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	Metanol 100 %
3B3	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	Metanol-Agua 50:50 %, v/v
4B4	<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	Metanol-Agua 50:50 %, v/v

Se realizaron 3 eluciones distintas, con el fin de evaluar la presencia de metabolitos relacionados con el efecto antioxidante, a saber, terpenoides, y polifenoles en general (ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas). Las fases móviles y los reveladores empleados en cada caso se describen en la **Tabla 2**. Las placas se observaron a luz visible y a longitudes de onda de $\lambda=254$ nm y $\lambda=366$ nm con ayuda del equipo TLC visualizer de CAMAG® (Muttenez, Suiza).

Tabla 2. Fases móviles y reveladores para las placas TLC.

Analito	Fase móvil	Revelador
Terpenoides	Tolueno: Cloroformo: Etanol 44.44: 44.44: 11.11 %, v/v/v	Anisaldehído / Ácido sulfúrico



Flavonoides	Tolueno: Dioxano: Ácido acético 75.63: 21.01: 3.36 %, v/v/v	Productos Naturales
Antioxidantes	Acetato de etilo: Metanol: Agua 80.97: 10.93: 8.1 %, v/v/v	DPPH

2.2.8 Pruebas de capacidad antioxidante

2.2.8.1 DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

Para esta técnica se requiere del reactivo DPPH a una concentración 0.2 mM, el cual fue sonificado por 3 minutos para garantizar su disolución. Para la preparación de la curva de calibración, se utilizó como patrón Trolox diluido en agua ultrapura. Se emplearon concentraciones de 800, 400, 200, 100, 50 y 25 mEq/L y un blanco.

En microtubos se colocó 1000 μ L de la solución de DPPH, 50 μ L de muestra o solución patrón y 200 μ L de metanol grado análisis. Cada muestra se trabajó por triplicado.

Una vez colocados todos los componentes mencionados, los tubos se incubaron a temperatura ambiente y en completa oscuridad durante 30 minutos. Luego, se tomó una alícuota de 100 μ L de cada tubo y se colocó en un pocillo de microplaca. Finalmente, la absorbancia de cada muestra fue medida en Microplate Reader H1 de SYNERGY® (Florida, Estados Unidos) a una longitud de onda de $\lambda = 517$ nm.

2.2.8.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

La solución necesaria para la técnica FRAP está conformada por una mezcla de 3 componentes combinados en una relación 10:1:1 v/v/v respectivamente, los cuales son:

- Solución buffer de ácido acético-acetato de sodio 300 mM, con pH de 3.6 a 4. Para este estudio el pH de la solución se ajustó a 3.85
- Solución de cloruro férrico 20 mM



- c) Solución de TPTZ (2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina) 10 mM disuelto en ácido clorhídrico 40 mM

La solución obtenida se calentó durante 10 minutos a 40 °C. Para la curva de calibración, se emplearon soluciones de Trolox de concentraciones de 400, 200, 100, 50 y 25 mEq/L, además se preparó un blanco.

Cada muestra fue trabajada por triplicado. En microtubos se colocó 20 μ L de muestra o patrón y 600 μ L de la mezcla de soluciones a, b y c. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Luego, se tomó una alícuota de 100 μ L de cada tubo y se transfirió a un pocillo de microplaca. La absorbancia de cada muestra fue medida en Microplate Reader a una longitud de onda de $\lambda = 593$ nm.

2.2.8.3 ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

Para este método se requiere de una solución formada por solución ABTS 7 mM y persulfato potásico 2.45 mM, las cuales se combinaron, protegidas de la luz, en proporciones iguales según necesidad y se dejó reposar durante 12-16 horas. Cabe mencionar que esta solución resultante se ajustó a una absorbancia de 0.7 (± 0.02) a $\lambda = 734$ nm.

Se preparó una curva de calibración empleando como patrón soluciones de Trolox a concentraciones de 800, 400, 200, 100, 50 y 25 mEq/L y un blanco. En microtubos se colocó 20 μ L de muestra (cada una por triplicado) y 800 μ L de la solución ABTS (mezcla). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente en la oscuridad durante 30 minutos, luego de lo cual se tomó una alícuota de 200 μ L de cada tubo y se transfirió a los respectivos pocillos de microplaca. Las absorbancias se midieron con ayuda de Microplate Reader a una longitud de onda de $\lambda = 734$ nm.

Los resultados de esta técnica se expresaron como equivalentes de Trolox (mmol de Trolox / L de muestra) y representan el porcentaje de inhibición de la formación del catión ABTS⁺ gracias al antioxidante, en un tiempo determinado.



2.2.8.4 Polifenoles totales - Método de Folin Ciocalteu

Es una técnica colorimétrica que se basa en reacciones de transferencia de electrones. Los compuestos fenólicos son capaces de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) generando la producción de azul de tungsteno, el cual se mide espectrofotométricamente, sabiendo que la intensidad de la coloración es directamente proporcional a la concentración de fenoles presentes en la muestra (Malta & Liu, 2014). Presenta importantes ventajas tales como ser sencillo, de bajo costo, reproducible y rápido (Galvão et al., 2018).

Este método emplea el denominado reactivo de Folin, que es una mezcla de fosfomolibdato y fosfowolframato al 10 %, además de una solución de Na_2CO_3 700 mM. Para la curva de calibración se empleó como patrón ácido gálico disuelto en agua destilada, formando soluciones en concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mEq/L, además de un blanco.

En microtubos se colocó una alícuota de 100 μL de muestra (cada una trabajada por triplicado) o solución patrón con 200 μL de solución de Folin al 10 % y se mezcló vigorosamente. Se dejó en reposo por un tiempo de 5 minutos para que la reacción se lleve a cabo.

Transcurrido este tiempo, se añadió 800 μL de Na_2CO_3 700 mM y se homogenizó con ayuda del vortex. Los tubos se incubaron en la oscuridad durante una hora a temperatura ambiente para que la reacción tenga lugar. Luego de este tiempo se revisaron los tubos; en el caso de existir notable precipitación, deben ser centrifugados, sin embargo, si no se evidencia precipitación, se continúa directamente. En este caso sí hubo precipitación, por lo que se centrifugaron los tubos a 6000 rpm (2822 RCF) durante 2 minutos.

De cada tubo se tomó una alícuota de 200 μL , la cual se colocó en un pocillo de microplaca y se midió su absorbancia mediante Microplate Reader a $\lambda = 765 \text{ nm}$.



2.2.9 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, en el cual se comparó las variables independientes (microalga, estado y solvente) frente a las variables dependientes (resultados de los ensayos DPPH, FRAP, ABTS y Polifenoles totales) así como sus interacciones, para comprender si existe variabilidad entre las muestras. Además, se llevó a cabo el test de Tukey, como un análisis post-hoc para explicar las diferencias existentes entre las muestras, en caso de haberlas. Se estableció un nivel de significancia de 0.05. Se construyeron gráficas para cada ensayo, en las cuales se muestra la concentración, ya sea de mEq Trolox / mL de extracto (DPPH, FRAP y ABTS) o de mEq Ácido gálico / mL de extracto (Polifenoles totales) para cada una de las muestras analizadas. Para realizar el análisis estadístico se empleó el software estadístico Infostat ® versión 2020.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Placas TLC

Luego de haber revelado cada una de las placas TLC, estas se dejaron secar hasta que el revelador se evapore. Posteriormente, se observaron a longitudes de onda de $\lambda = 366$ nm, $\lambda = 245$ nm y luz visible, y se midió la relación de frente (Rf) de las bandas cromatográficas de interés.

3.1.1 Antioxidantes

En la **Figura 3** se presenta la placa de antioxidantes a una longitud de $\lambda = 366$ nm. Se observaron bandas cromatográficas de coloración en su mayoría rojas; no obstante, en la base (Rf = 0) se evidenció una coloración azul intensa en prácticamente todos los extractos, que pueden representar la presencia de antioxidantes tipo ácidos fenólicos. Adicionalmente, se evidenció que el extracto metanólico de *Hapalosiphon sp.* fresca (1A1) y el extracto liofilizado de *Hapalosiphon sp.* obtenido con solvente metanol-agua 50:50 %, v/v (4A4) presentaron una banda cromatográfica con Rf = 0.70 y 0.69 respectivamente, lo cual podría tratarse de compuestos de tipo ácidos fenólicos, que no se observó en el extracto metanólico de *Hapalosiphon sp.* liofilizada (2A2) ni en el extracto fresco de *Hapalosiphon sp.* obtenido con metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente (3A3). En el extracto metanólico de *Nannochloropsis oculata* fresca (2B2) se observó una banda cromatográfica con Rf = 0.89, ausente en los otros extractos de la misma microalga, al igual que la banda cromatográfica con Rf = 0.70 presente en el extracto de *Nannochloropsis oculata* liofilizada obtenido con metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente (4B4).

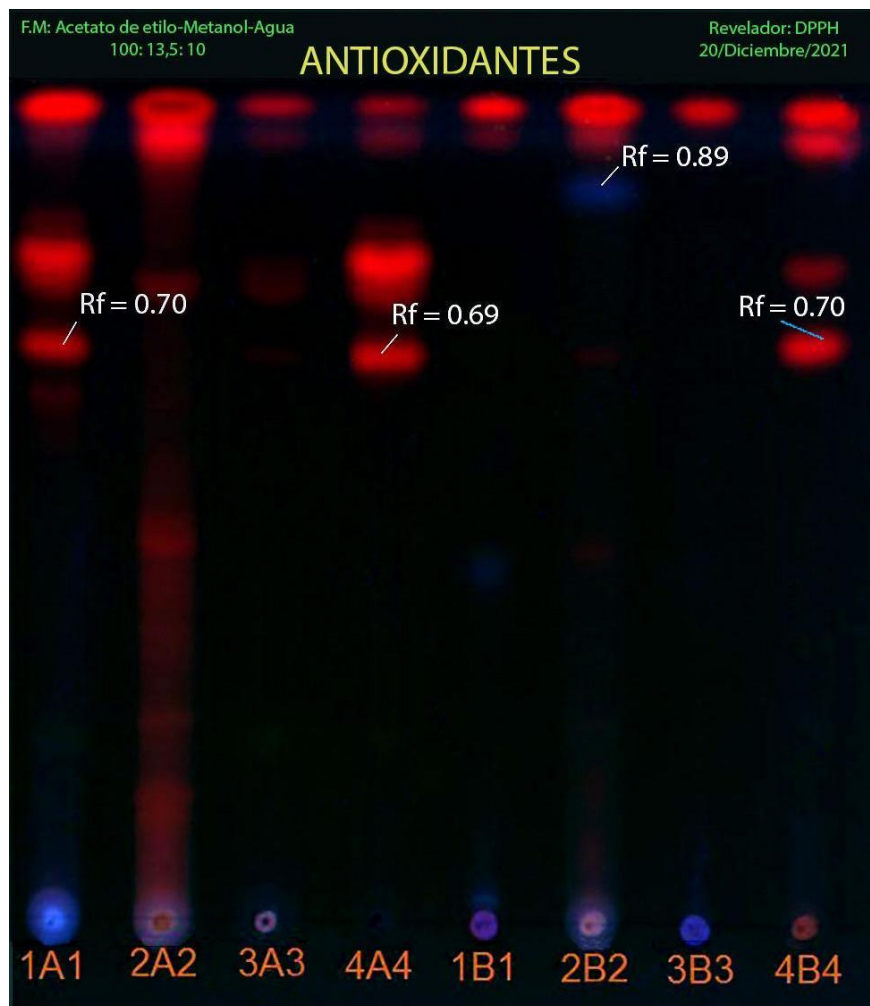


Figura 3. Antioxidantes de los extractos en placa TLC a $\lambda = 366$ nm. Fuente: Autora.

La **Figura 4** muestra la placa cromatográfica revelada con DPPH y evaluada a luz visible. Los antioxidantes en placa TLC revelados con DPPH se observan como bandas con una coloración blanca-amarillenta en un fondo púrpura a la luz visible (Zamora, 2017). Esto no se evidenció en ninguna muestra analizada en esta placa. A pesar de existir bandas cromatográficas de aspecto amarillento cerca de la línea de frente, no presentaron la coloración característica de los antioxidantes.

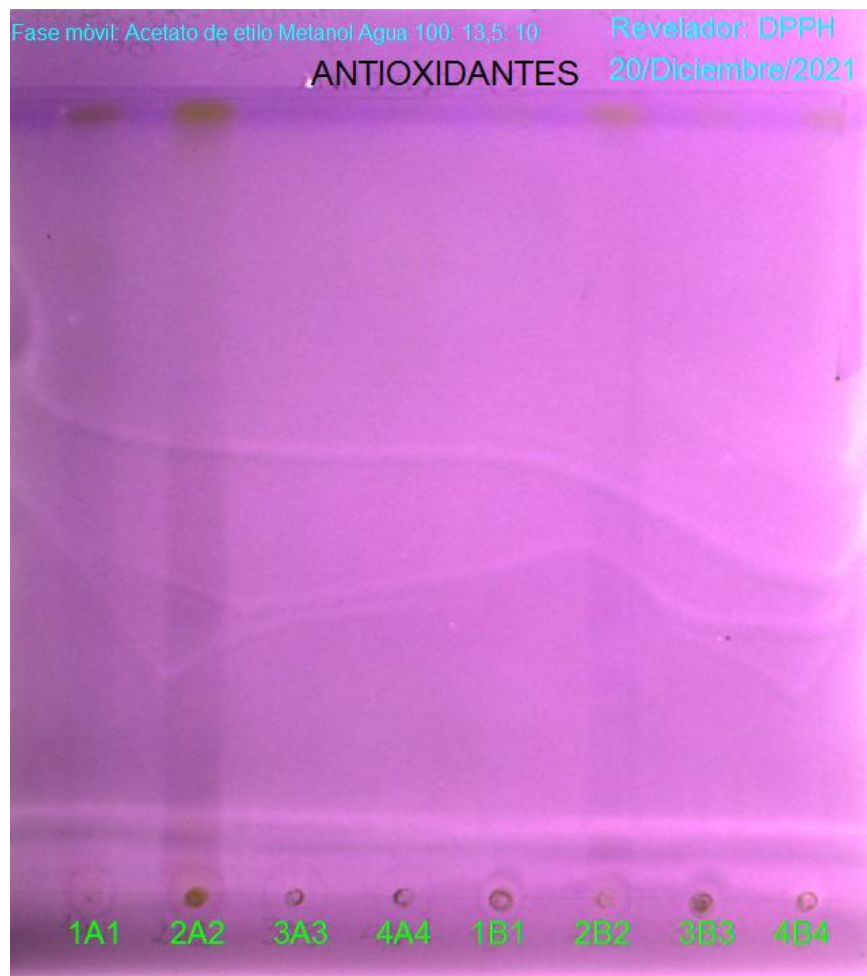


Figura 4. Antioxidantes de los extractos en placa TLC en luz visible. Fuente: Autora.

3.1.2 Flavonoides

En la **Figura 5** se observa la placa cromatográfica revelada por PEG/Productos Naturales y evaluada a una longitud de onda de $\lambda = 365$ nm. Se pudo ver que en el extracto de *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol 100 % como solvente (1A1) y el extracto metanólico de *Hapalosiphon sp.* liofilizada (2A2) existió una banda cromatográfica marcada con $R_f = 0.57$ y 0.56 respectivamente, la cual podría corresponder a un mismo compuesto, además de otras bandas comunes con un R_f mayor. En el extracto metanólico de *Nannochloropsis oculata* liofilizada (2B2) se evidenció una banda cromatográfica de coloración azul intensa con $R_f = 0.45$, ausente en otros extractos. Por las características del revelador y la longitud

empleada, esta coloración podría corresponder a ácidos fenólicos, pero no se consideró su empleo como patrones al no existir reportes de concentraciones mayores de estos productos en este tipo de microorganismos (Haoujar et al., 2019). En la línea de siembra ($R_f = 0$) se observaron ciertas muestras con bandas azules, lo cual podría significar la presencia de ácidos fenólicos o compuestos fenólicos del tipo cumarinas (Zamora, 2017).

En los extractos de *Nannochloropsis oculata* liofilizada tanto con metanol 100 % (2B2) como con metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente (4B4) se presentó una banda cromatográfica con $R_f = 0.71$, la cual pudiese corresponder al mismo compuesto.

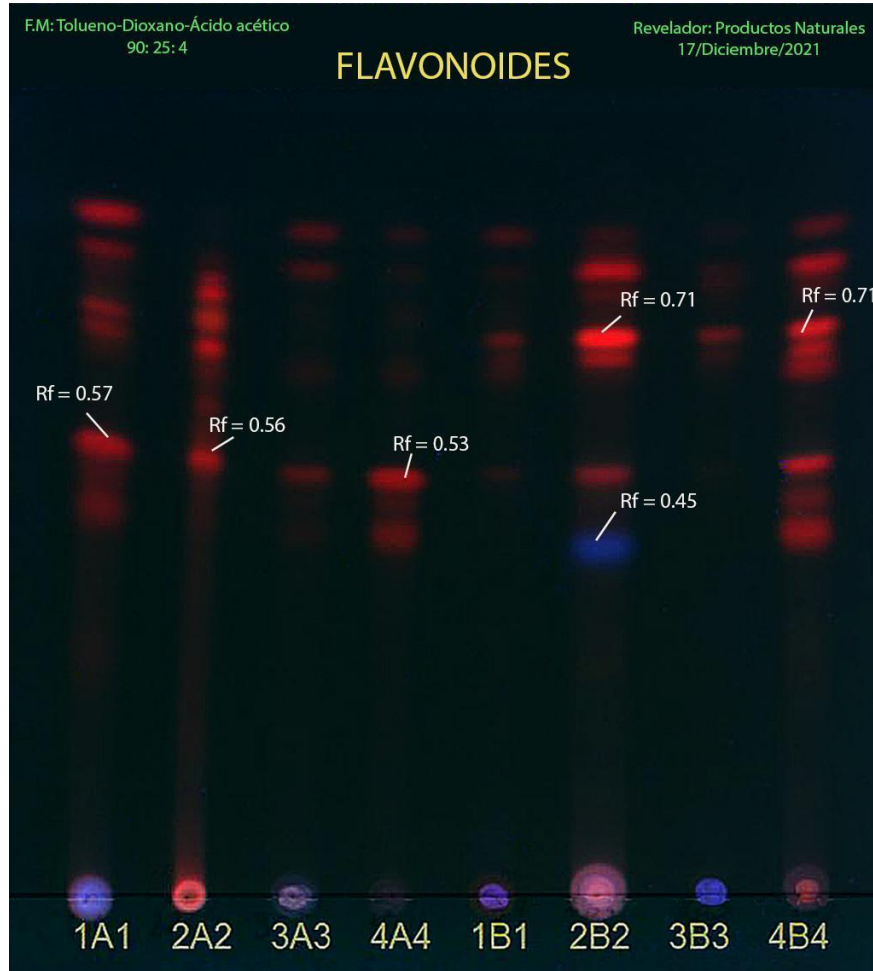


Figura 5. Flavonoides de los extractos en placa TLC a $\lambda = 366$ nm. Fuente: Autora.



3.1.3 Terpenoides

La **Figura 6** muestra la placa cromatográfica correspondiente a la evaluación de terpenoides. Estos compuestos se observan a luz visible de una coloración que va de azul, verde, roja e incluso café (Zamora, 2017). En esta placa se evidenciaron bandas cromatográficas esencialmente verdes, que podrían significar la presencia de este tipo de moléculas. A pesar de que los solventes utilizados en esta investigación son de naturaleza polar, la presencia importante de fucoxantinas en estas microalgas puede explicar la presencia de bandas con coloración característica. Es importante destacar que los extractos metanólicos de *Hapalosiphon sp.* tanto fresca (1A1) como liofilizada (2A2) presentaron más bandas cromatográficas que los extractos de la misma microalga, pero con metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente (3A3 y 4A4) a pesar de ser la misma microalga, por lo que se deduciría que la extracción de terpenoides con metanol 100 % es mayor para *Hapalosiphon sp.*

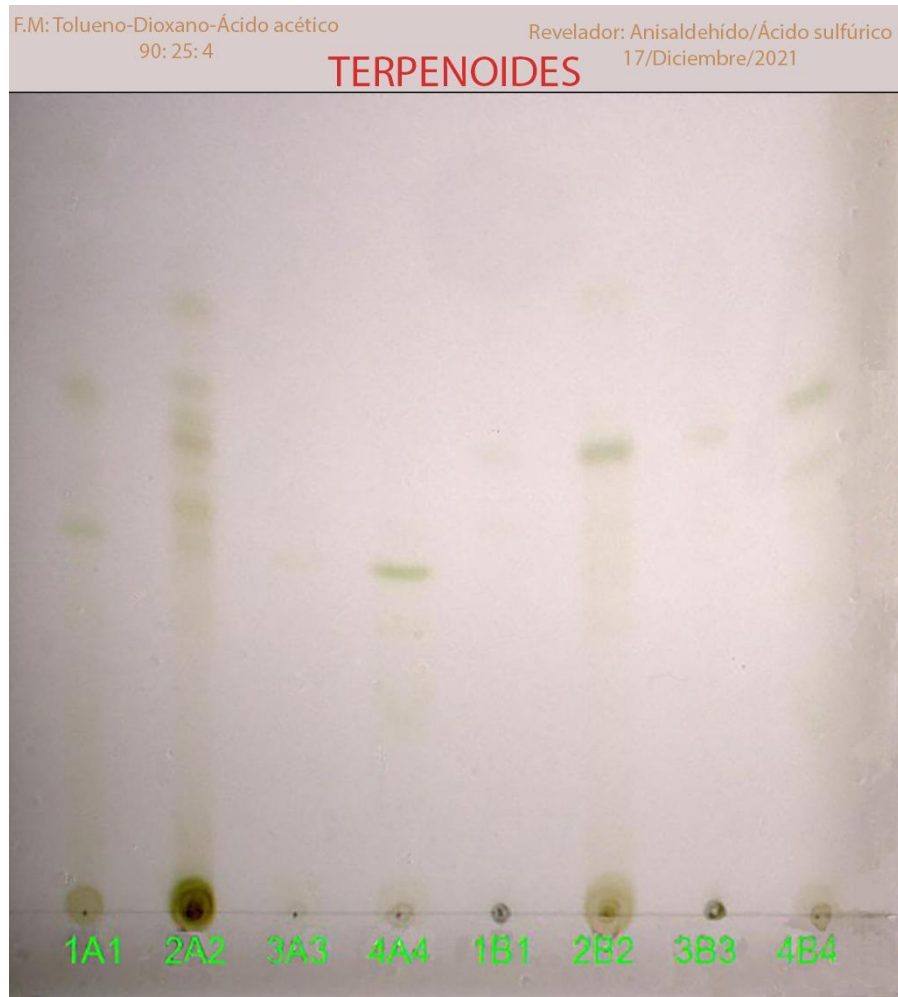


Figura 6. Terpenoides de los extractos en placa TLC en luz visible. Fuente: Autora.

3.2 Capacidad antioxidante

Los análisis de capacidad antioxidante se llevaron a cabo empleando las técnicas de DPPH, FRAP, ABTS y polifenoles totales. Para ello, se trabajó con extractos en concentraciones de 5 mg/mL.

3.2.1 Curvas de calibración

Para la elaboración de las curvas de calibración se midieron las absorbancias del blanco y los patrones respectivos para cada ensayo. Con dichos valores, se obtuvo una recta mediante regresión lineal, así como su ecuación.

A continuación, se presentan las curva de calibración de las técnicas de medición de capacidad antioxidante. La de DPPH se presenta en la **Figura 7**, la de FRAP en la **Figura 8**, la de ABTS en la **Figura 9** y la de Polifenoles totales en la **Figura 10**.

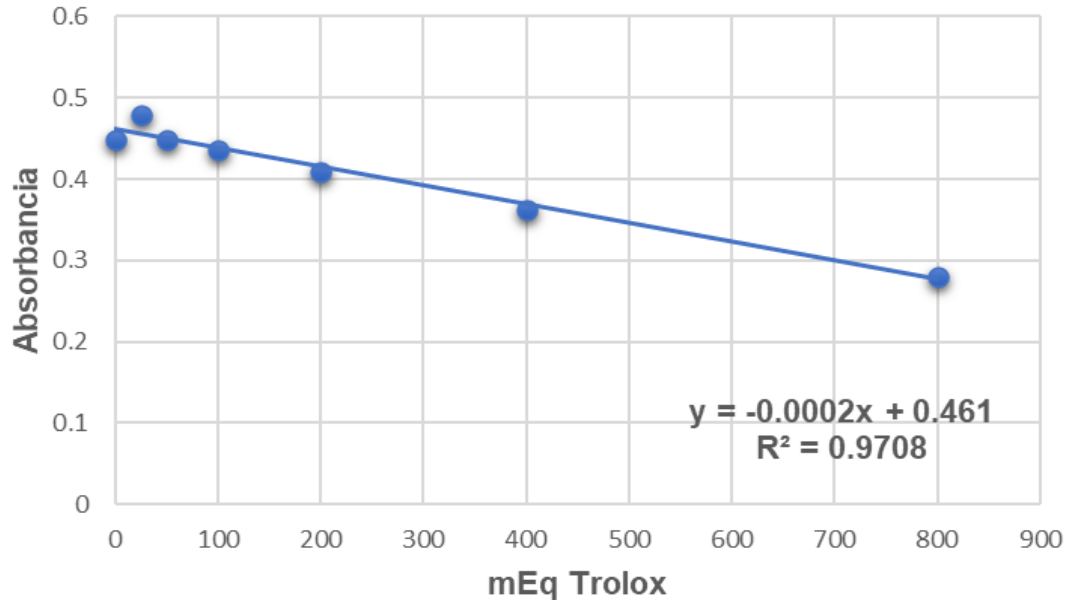


Figura 7. Curva de calibración de la técnica DPPH. Fuente: Autora.

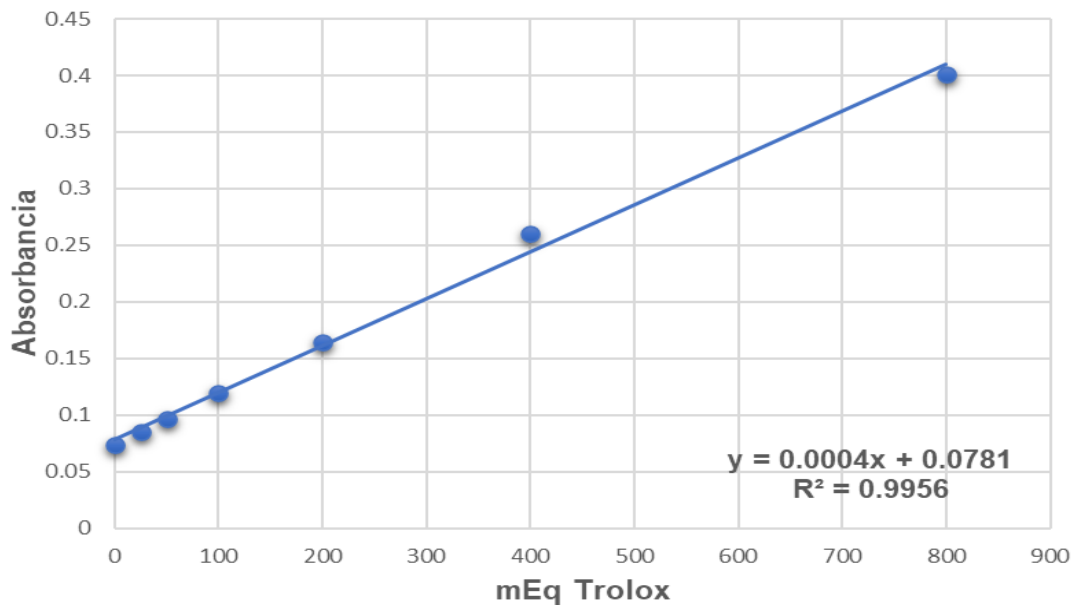


Figura 8. Curva de calibración de la técnica FRAP. Fuente: Autora.

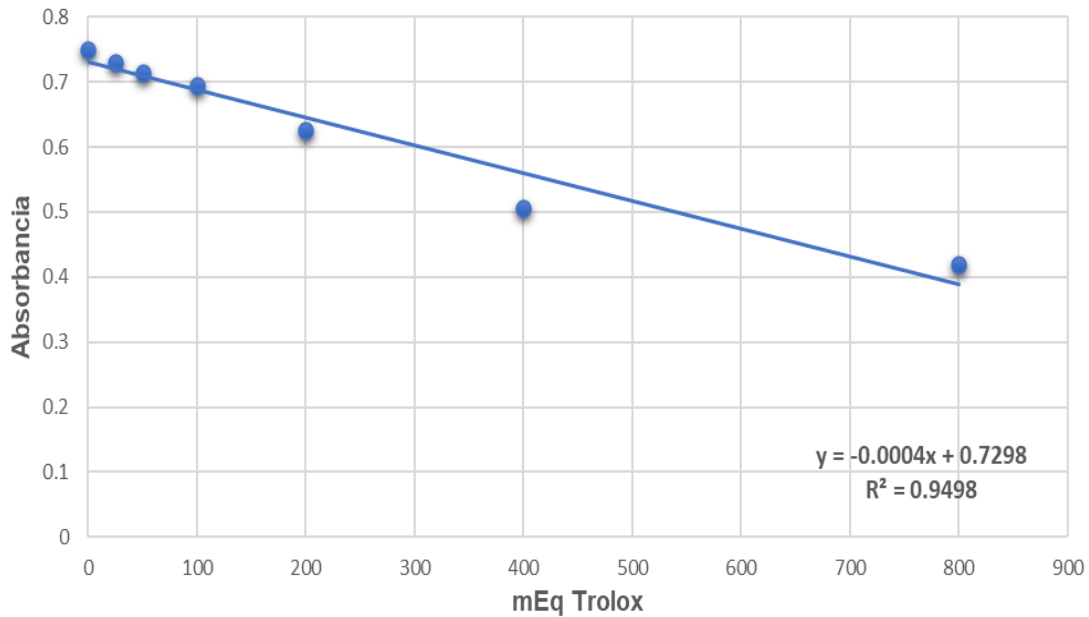


Figura 9. Curva de calibración de la técnica ABTS. Fuente: Autora.

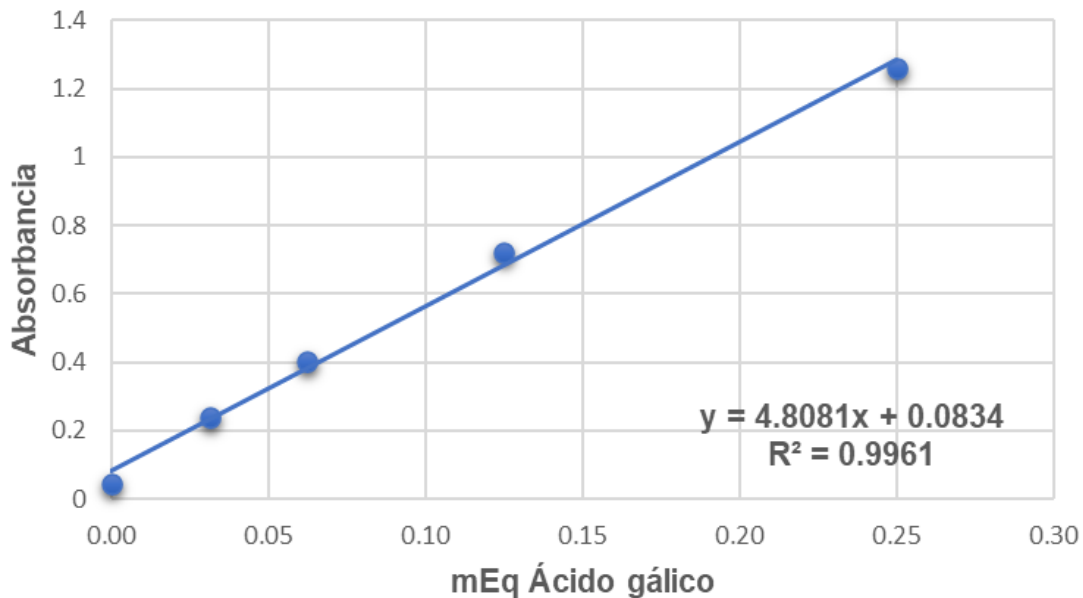


Figura 10. Curva de calibración de la técnica polifenoles totales. Fuente: Autora.

3.2.2 Resultados de las muestras

Al reemplazar los valores de las absorbancias en las respectivas ecuaciones de la recta, se calcularon los resultados de mEq de Trolox / mL (DPPH, FRAP y ABTS) y de mEq de ácido gálico / mL (polifenoles totales) de extracto de cada microalga. De



cada una, según el estado y el solvente empleado se realizaron determinaciones por triplicado, por lo cual se consiguieron 9 resultados para cada una. En la **Tabla 3** se muestran los promedios de dichos resultados con sus respectivas desviaciones estándar.

Tabla 3. Promedios de los resultados obtenidos del análisis de la capacidad antioxidante.

Microalga	Estado	Solvente de extracción	DPPH (mEq Trolox/mL extracto)	FRAP (mEq Trolox/mL extracto)	ABTS (mEq Trolox/mL extracto)	Polifenoles totales (mEq Ácido gálico/mL extracto)
<i>Hapalosiphon sp.</i>	F	M	464.4 ± 41.26	382.5 ± 29.90	830.1 ± 20.51	0.07261 ± 0.002129
<i>Hapalosiphon sp.</i>	L	M	111.7 ± 53.33	545.6 ± 32.04	506.2 ± 24.46	0.05034 ± 0.0002571
<i>Hapalosiphon sp.</i>	F	MA	821.7 ± 45.96	336.9 ± 36.28	365.1 ± 13.88	0.06020 ± 0.001237
<i>Hapalosiphon sp.</i>	L	MA	290.0 ± 30.31	354.7 ± 60.80	31.06 ± 25.11	0.01343 ± 0.0003749
<i>Nannochloropsis oculata</i>	F	M	296.1 ± 144.5	384.7 ± 37.14	6.611 ± 9.464	0.01879 ± 0.0004385
<i>Nannochloropsis oculata</i>	L	M	379.4 ± 42.38	618.9 ± 34.77	846.6 ± 41.52	0.02663 ± 0.0008261
<i>Nannochloropsis oculata</i>	F	MA	335.00 ± 28.94	332.2 ± 24.55	441.4 ± 24.01	0.01133 ± 0.0002837
<i>Nannochloropsis oculata</i>	L	MA	290.39 ± 82.63	525.0 ± 72.09	494.6 ± 21.68	0.03698 ± 0.0006559

Nota. F: Fresca, L: Liofilizada, M: Metanol 100 %, MA: Metanol-agua 50:50 %, v/v.

Los valores de cada una de las determinaciones para cada muestra se presentan en el **Anexo 2**.



3.3 Análisis estadístico

3.3.1 DPPH

La **Figura 11** muestra los resultados obtenidos para el ensayo con DPPH. En esta, se evidenció que la muestra con mayor cantidad de antioxidantes, expresados como mEq Trolox/mL de extracto fue la microalga *Hapalosiphon sp.* en estado fresco y con solvente metanol-agua 50:50 %, v/v (3A3). Por su parte, la microalga con menor cantidad de antioxidantes fue *Hapalosiphon sp.* liofilizada con solvente metanol 100 % (2A2).

Adicionalmente, las concentraciones de antioxidantes para las muestras *Hapalosiphon sp.* liofilizada con solvente metanol-agua 50:50 %, v/v (4A4), *Nannochloropsis oculata* liofilizada con metanol-agua 50:50 %. v/v (4B4), *Nannochloropsis oculata* fresca con solvente metanol 100 % (1B1) y *Nannochloropsis oculata* fresca con metanol-agua 50:50 %, v/v (3B3) no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0.05$), y se encuentran representadas con la letra B en el gráfico. Lo mismo ocurre con *Nannochloropsis oculata* liofilizada con solvente metanol 100 % (2B2), la cual no presentó diferencia estadística ($p > 0.05$), al compararse con *Nannochloropsis oculata* fresca con metanol-agua 50:50 %, v/v (3B3) y *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol 100 % (1A1).

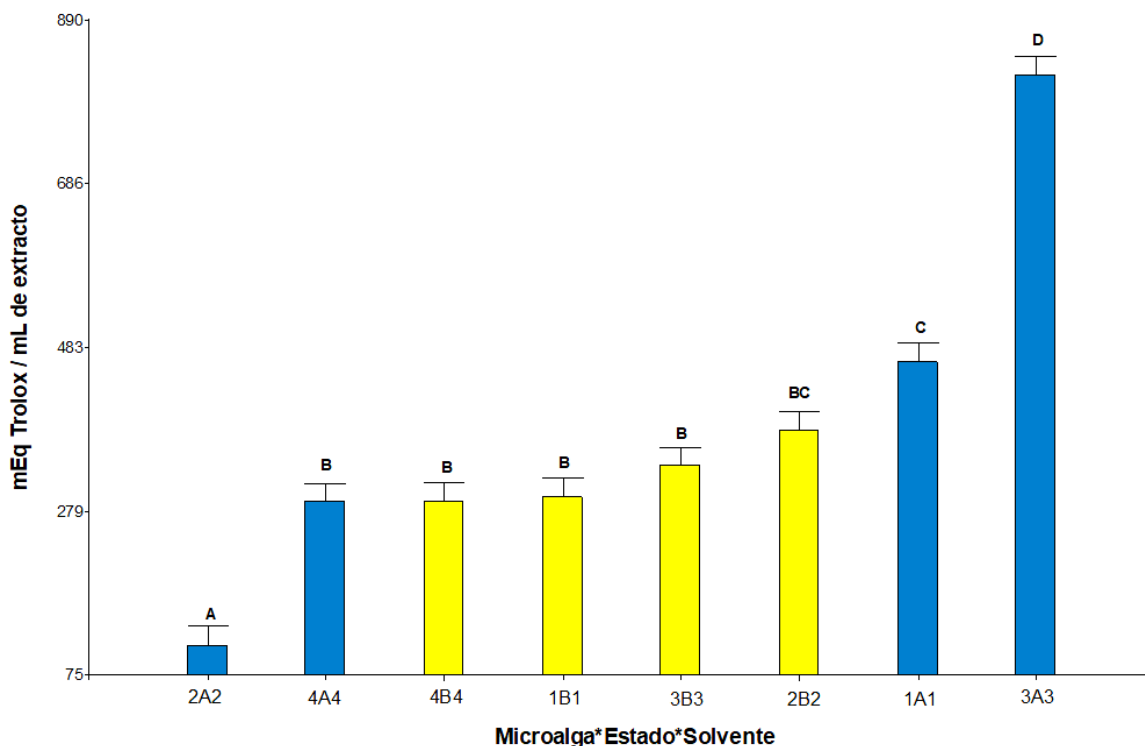


Figura 11. Análisis de varianza de las muestras para la técnica DPPH. Fuente: Autora.

Nota. La microalga *Nannochloropsis oculata* se encuentra representada con color amarillo, y la microalga *Hapalosiphon sp.* está representada en color azul. Se muestran las medias de los valores obtenidos con sus respectivas barras de error.

Los resultados completos del análisis estadístico para este ensayo se encuentran en el **Anexo 3**.

3.3.2 FRAP

Luego de realizado el ensayo con FRAP, se obtuvo la gráfica de la **Figura 12**. En esta se evidenció que la muestra con mayor cantidad de antioxidantes, expresados como mEq Trolox/mL de extracto fue la microalga *Nannochloropsis oculata* liofilizada y con extracción en metanol 100 % (2B2). Por su parte, la microalga con menor cantidad de antioxidantes fue *Nannochloropsis oculata* en estado fresco con extracción con solvente metanol-agua en proporción 50:50 %, v/v (3B3).

No existió una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol-agua 50:50 %, v/v (3A3), liofilizada con metanol-agua 50:50 %, v/v (4A4), fresca con metanol 100 % (1A1), *Nannochloropsis oculata* fresca con metanol-agua 50:50 %, v/v (3B3) y fresca con metanol 100 % (1B1). Todas ellas representadas con la letra A.

Asimismo, no se evidenció diferencia estadísticamente significativa entre *Nannochloropsis oculata* liofilizada con solvente metanol-agua 50:50 %, v/v (4B4) y *Hapalosiphon sp.* liofilizada con metanol 100 % (2A2). Ambas se encuentran representadas por la letra B.

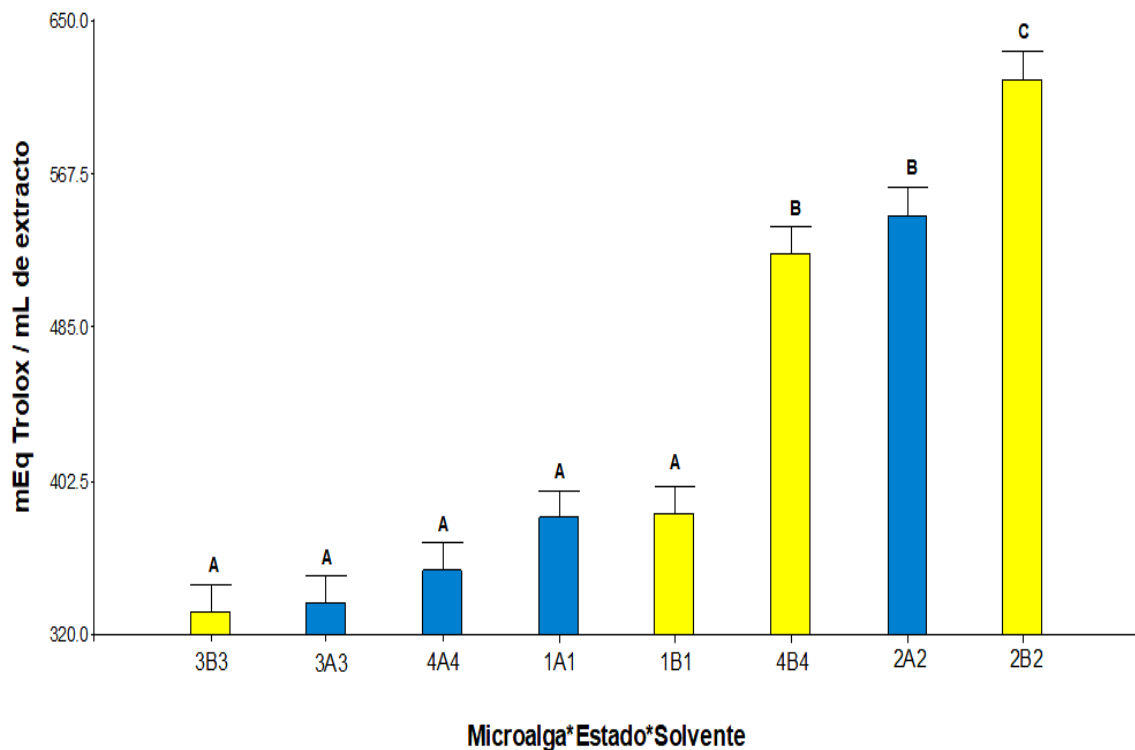


Figura 12. Análisis de varianza de las muestras para la técnica FRAP. Fuente: Autora.

Nota. Se presentan las medias de los valores obtenidos en el ensayo, cada una con su barra de error. El color amarillo representa a la microalga *Nannochloropsis oculata*, y el azul a la microalga *Hapalosiphon sp.*



Los resultados completos del análisis estadístico para este ensayo se encuentran en el **Anexo 4**.

3.3.3 ABTS

La **Figura 13** muestra los resultados para el método ABTS. En esta, se evidenció que la microalga con mayor cantidad de antioxidantes, expresados como mEq Trolox/mL de extracto fue *Nannochloropsis oculata* liofilizada con metanol 100 % (2B2); no obstante, esta no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol 100 % (1A1), ambas representadas con la letra E.

Por su parte, la microalga con menor cantidad de antioxidantes fue *Nannochloropsis oculata* fresca con metanol 100 % (1B1), aunque esta no mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con *Hapalosiphon sp.* liofilizada con metanol-agua 50:50 %, v/v (4A4), ambas representadas con la letra A.

Además, se determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) entre *Nannochloropsis oculata* liofilizada con metanol-agua 50:50 %, v/v (4B4) y *Hapalosiphon sp.* liofilizada con metanol 100 % (2A2). Ambas se encuentran representadas con la letra D.

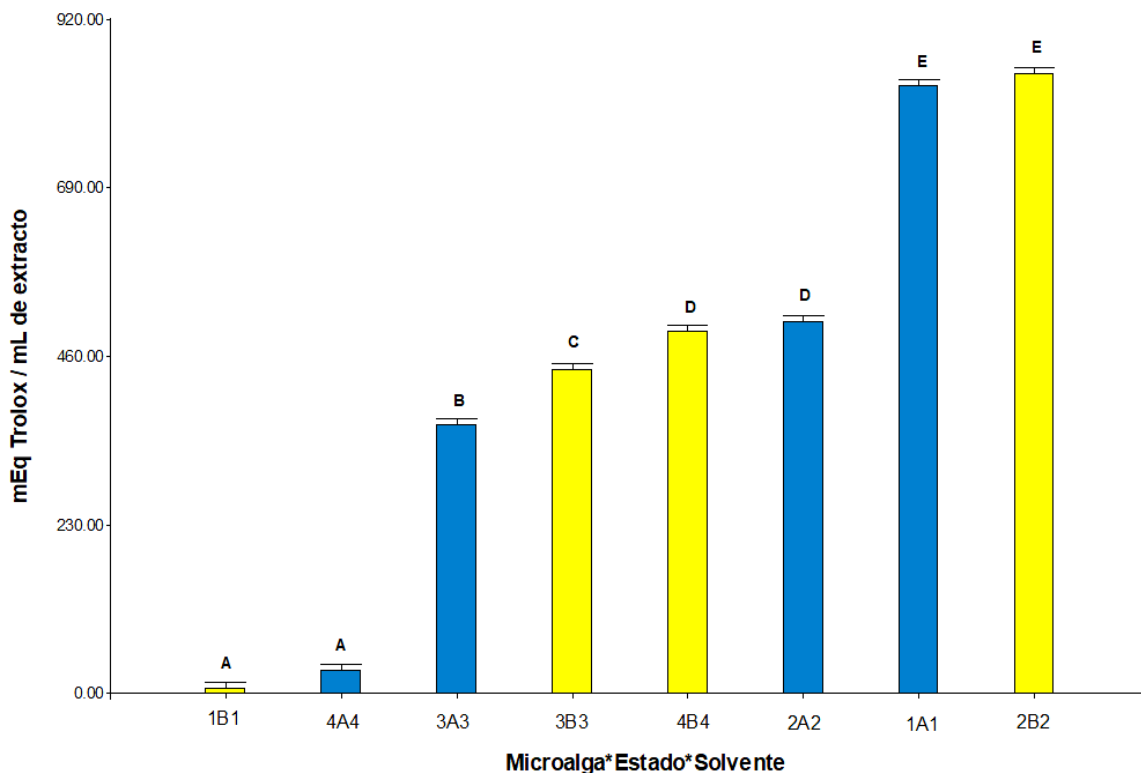


Figura 13. Análisis de varianza de las muestras para la técnica ABTS. Fuente: Autora.

Nota. Cada columna representa la media de los valores obtenidos en el ensayo con su respectiva barra de error. La microalga *Nannochloropsis oculata* está representada con el color amarillo, y *Hapalosiphon sp.* con el color azul.

Los resultados completos del análisis estadístico para este ensayo se encuentran en el **Anexo 5**.

3.3.4 Polifenoles totales

Los resultados del ensayo de polifenoles totales se presentan en la **Figura 14**. En esta, se observó que la microalga con mayor cantidad de polifenoles, expresados como mEq Ácido gálico/mL de extracto fue *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol 100 % (1A1), mientras que la microalga con menor cantidad de polifenoles fue *Nannochloropsis oculata* fresca con solvente metanol-agua 50:50 %, v/v (3B3).

Cabe destacar que existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre todas las muestras analizadas mediante este ensayo. Esto se puede evidenciar en los resultados completos del análisis estadístico para este ensayo, en el **Anexo 6**.

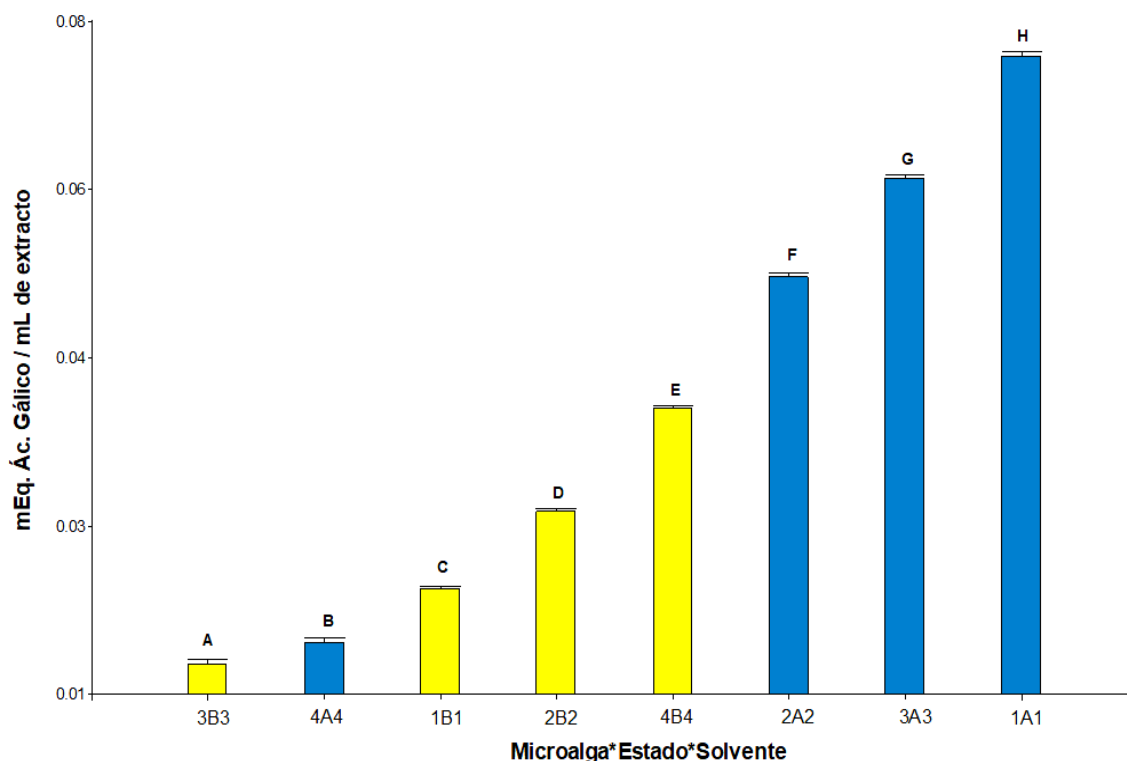


Figura 14. Análisis de varianza de las muestras para la técnica Polifenoles Totales. Fuente: Autora.

Nota. Las barras de color amarillo representan la microalga *Nannochloropsis oculata*, y las azules, *Hapalosiphon sp.* La columna muestra la media de los valores obtenidos con su respectiva barra de error.

El análisis de cromatografía de capa fina (TLC) se usó como una técnica de screening de compuestos antioxidantes, en el cual se evidenció que en los extractos de las microalgas *Nannochloropsis oculata* y posible *Hapalosiphon sp.* existen tanto terpenoides como flavonoides, compuestos que han demostrado poseer una importante capacidad antioxidante, y que, al ser de origen natural son prometedoras



alternativas para el uso industrial (Gutiérrez et al., 2021). No obstante, se debe tener en cuenta que ciertos compuestos presentes en los extractos, tales como las clorofilas, pigmentos y xantofilas pueden también producir coloraciones que se evidencian como interacciones en las placas TLC, por lo que los resultados obtenidos con esta técnica se deben considerar únicamente como un punto de partida para el análisis de los extractos.

Es importante resaltar la diferencia entre actividad antioxidante y actividad antiradicadilaria. La primera hace referencia a la capacidad de una sustancia para retardar la degradación oxidativa, mientras que la segunda se refiere a la relación entre el antioxidante y el radical libre que se da para estabilizarlo (Londoño, 2012).

Para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto o una muestra, un único ensayo no es suficiente. Por ello, es recomendable emplear diferentes técnicas que inclusive pueden variar en principio, tales como un mecanismo de transporte de electrones (TE) o un mecanismo de transporte de átomos de hidrógeno (TAH) (Rahman et al., 2015).

De los métodos empleados en este estudio, tanto ABTS como DPPH se fundamentan en ambos mecanismos, TE y TAH; por su parte, FRAP se fundamenta únicamente en TE. La determinación de polifenoles totales se basa en la capacidad redox de dichos compuestos; no obstante, no es una técnica de determinación de antioxidantes propiamente (Huet, 2017; Londoño, 2012).

Al observar los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos se evidenció que no existiría una muestra con mayor cantidad de antioxidantes en todas las técnicas. Sin embargo, la microalga con valores más elevados en este ensayo fue *Nannochloropsis oculata* en estado liofilizado y con extracción en metanol 100 % (2B2), la cual presentó la mayor concentración de antioxidantes tanto en ABTS como FRAP. Es importante recalcar que ABTS es el método más idóneo para determinar antioxidantes tanto lipofílicos como hidrofílicos, en comparación con FRAP y DPPH (Londoño, 2012).



Por su parte, el extracto metanólico 100 % de *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol 100 % (1A1) fue la muestra que presentó la mayor cantidad de polifenoles totales, y fue estadísticamente similar al extracto metanólico 100 % de *Nannochloropsis oculata* liofilizada en cuanto a antioxidantes en el ensayo ABTS. Sin embargo, en el ensayo DPPH se obtuvo que la muestra con mayor cantidad de antioxidantes fue *Hapalosiphon sp.* fresca con metanol-agua 50:50 %, v/v como solvente de extracción.

La variación entre estos resultados indicó que, de manera general, no se podría establecer el mejor solvente (metanol vs metanol-agua 50:50 %, v/v) o estado (fresca vs liofilizada) para ambas microalgas en cuanto a la extracción de compuestos antioxidantes. Así, mientras que *Hapalosiphon sp.* demostró mejores resultados extractivos en biomasa fresca, para *Nannochloropsis oculata* la biomasa liofilizada fue mejor. Adicionalmente, *Nannochloropsis oculata* evidenció mejor extracción cuando se empleó metanol 100 % como solvente de extracción; mientras que para *Hapalosiphon sp.*, la extracción de antioxidantes fue mayor con metanol 100 %, pero la de polifenoles fue mejor con metanol-agua 50:50 %, v/v.

Para poder esclarecer estas diferencias es importante recalcar ciertos parámetros de cada especie. En cuanto a la pared celular, *Nannochloropsis oculata* está compuesta principalmente por carbohidratos, de los cuales al rededor del 68 % son glucosa y celulosa, además poseen algenanos en gran cantidad, compuestos que son derivados lipídicos muy resistentes a la hidrólisis ácida y alcalina (Scholz et al., 2014). A pesar de que no existen estudios sobre la composición de la pared celular de *Hapalosiphon sp.*, se ha determinado que, al ser una cianobacteria, se encuentra constituida principalmente por peptidoglicano, lípidos, proteínas y carotenoides (Woitzik et al., 2012).

Al contrastar esto con los resultados obtenidos se podría atribuir que, la mayor capacidad extractiva de compuestos antioxidantes de *Nannochloropsis oculata* con metanol 100 % se deba a que la solubilidad de los carbohidratos presentes en la pared celular es mayor en solventes polares; de igual manera, los algenanos al ser



compuestos derivados de los ácidos grasos, su solubilidad es mayor en metanol 100 %, que en la mezcla metanol-agua 50:50 %, v/v.

En cuanto a *Hapalosiphon sp.* se evidenció mayor rendimiento extractivo con metanol 100 % para el contenido de polifenoles totales; esto podría deberse a que la mayoría de dichos compuestos son solubles en solventes polares, a pesar de que algunos estudios sugieren una mayor extracción de polifenoles en agua, también se han encontrado mejores resultados extractivos con alcoholes, ya que su polaridad es semejante (Beltrán et al., 2013)

En cuanto al estado de conservación de la biomasa, se evidenció que para *Nannochloropsis oculata* fue mejor el estado liofilizado, mientras que para *Hapalosiphon sp.* fue mejor el estado fresco. Esto podría suceder debido a que durante el proceso de liofilización ciertos componentes de la pared celular se compactan y dificultan la extracción.



4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Tras finalizar este trabajo de titulación se puede concluir que:

La capacidad antioxidante es variable según la especie, solvente y estado de la biomasa. Para la extracción de compuestos antioxidantes de la microalga *Nannochloropsis oculata* el mayor resultado extractivo se obtuvo al partir de biomasa liofilizada y empleando metanol al 100 % como solvente; mientras que para *Hapalosiphon sp.* el mayor resultado extractivo se obtuvo al partir de biomasa fresca y empleando como solvente la mezcla metanol-agua 50:50 %, v/v.

No existen condiciones específicas de solvente y estado de biomasa que garanticen la extracción más óptima de moléculas antioxidantes para microalgas y cianobacterias.

4.2 Recomendaciones

- Emplear los datos obtenidos como un punto de partida para la identificación y caracterización de la microalga *Hapalosiphon sp.*
- Continuar con el estudio de compuestos antioxidantes presentes en microalgas y cianobacterias, para poder identificarlos y cuantificarlos.
- Realizar el análisis antioxidante de las especies empleando técnicas más eficientes como ORAC, la cual no se pudo aplicar en este trabajo por limitaciones de equipos y costos.



REFERENCIAS

- Amouzad, M., Abedian, A., Rezaei, M., & Mirzakhani, M. K. (2019). Antioxidant and Antibacterial Effects of Vitamins C and E Alone or a Combination on Microalgae (*Nannochloropsis oculata*) Paste Quality during Cold Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(10), 1051–1062. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1683108>
- Batista, A. P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I., & Raymundo, A. (2017). Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. *Algal Research*, 26(211), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>
- Beltrán, Y., Morris, H. J., De la Cruz, E. R., Quevedo, Y., & Bermúdez, R. C. (2013). Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 32(2), 121–129. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000200001
- Bender, A. B. B., Goulart, F. R., Silva, L. P. da, & Penna, N. G. (2019). Micronization and extrusion processing on the physicochemical properties of dietary fiber. *Ciência Rural*, 49(7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190154>
- Castillo, Y., & Riverón, G. (2014). Superóxido dismutasa citosólica y enfermedades genéticas. Cytosolic superoxide dismutase and genetic diseases. *Rev Cubana Genet Comunit*, 8(1), 5–11. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubgencom/cgc-2014/cgc141a.pdf>
- Cheersonic. (2014, April 30). *The principle of Ultrasonic Extraction*. Cheersonic. <https://www.cheersonic.com/the-principle-of-ultrasonic-extraction/>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2016). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A Review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (pp. 16–57).
- Chilczuk, T., Steinborn, C., Breinlinger, S., Zimmermann-Klemd, A. M., Huber, R., Enke, H., Enke, D., Niedermeyer, T. H. J., & Gründemann, C. (2019).



- Hapalindoles from the Cyanobacterium Hapalosiphon sp. Inhibit T Cell Proliferation. *Planta Medica*, 86(02), 96–103. <https://doi.org/10.1055/a-1045-5178>
- Coêlho, D. de F., Tundisi, L. L., Cerqueira, K. S., Rodrigues, J. R. da S., Mazzola, P. G., Tambourgi, E. B., & Souza, R. R. de. (2019). Microalgae: Cultivation Aspects and Bioactive Compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2020). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*, 9(1), 10. <https://doi.org/10.3390/pr9010010>
- Del Mondo, A., Smerilli, A., Ambrosino, L., Albin, A., Noonan, D. M., Sansone, C., & Brunet, C. (2021). Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(2), 155–171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284>
- Friedl, T., Rybalka, N., & Kryvenda, A. (2012). 2 Phylogeny and systematics of microalgae: An overview. *Microalgal Biotechnology: Potential and Production*, 5(7), 11–38. <https://doi.org/10.1515/9783110225020.11>
- Fu, W., Nelson, D. R., Yi, Z., Xu, M., Khraiweh, B., Jijakli, K., Chaiboonchoe, A., Alzahmi, A., Al-Khairi, D., Brynjolfsson, S., & Salehi-Ashtiani, K. (2017a). Bioactive Compounds From Microalgae: Current Development and Prospects. *Studies in Natural Products Chemistry*, 54, 199–225. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63929-5.00006-1>
- Galvão, M. A. M., Arruda, A. O. de, Bezerra, I. C. F., Ferreira, M. R. A., & Soares, L. A. L. (2018). Evaluation of the Folin-Ciocalteu Method and Quantification of Total Tannins in Stem Barks and Pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul) L. P. Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61(0). <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018170586>
- Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52(98), 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology*



Advances, 33(2), 243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>

Gutiérrez, I., López, S., Magadán, P., Fernández, L., Pérez, Á., Tuñón, M., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2021). Terpenoids and Polyphenols as Natural Antioxidant Agents in Food Preservation. *Antioxidants*, 10(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>

Haoujar, I., Cacciola, F., Abrini, J., Mangraviti, D., Giuffrida, D., Oulad El Majdoub, Y., Kounoun, A., Miceli, N., Fernanda Taviano, M., Mondello, L., Rigano, F., & Skali Senhaji, N. (2019). The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules*, 24(22), 4037. <https://doi.org/10.3390/molecules24224037>

Huet, C. (2017). *Métodos Analíticos para la Determinación de Antioxidantes en Muestras Biológicas* (pp. 6–17) [Tesis de pregrado]. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/CRISTINA%20HUET%20BRE%C3%91A.pdf>

Jerez, I., García, S., Rodríguez, G., Rico, M., Afonso, C., & Gómez, J. L. (2017). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains. *Journal of Food Quality*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/2924508>

Kagan, M. L., & Matulka, R. A. (2015). Safety assessment of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Toxicology Reports*, 2(2), 617–623. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.008>

Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>

Klinthong, W., Yang, Y.-H., Huang, C.-H., & Tan, C.-S. (2015). A Review: Microalgae and Their Applications in CO₂ Capture and Renewable Energy. *Aerosol and Air Quality Research*, 15(2), 712–742. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2014.11.0299>

Lam, G. (2017). *Harvesting and Cell Disruption of microalgae* (pp. 10–25) [Tesis de Doctorado]. <https://edepot.wur.nl/412263>



- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y.-K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 244(45), 1317–1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad PARTE III / PART III*. Corporación Universitaria Lasallista. <http://hdl.handle.net/10567/133>
- López, J. F., García, P., Palma, D., Álvarez, C. A., Paredes, J. C., & Márquez, F. J. (2020). Continuous Microalgal Cultivation for Antioxidants Production. *Molecules*, 25(18), 4171. <https://doi.org/10.3390/molecules25184171>
- Malta, L. G., & Liu, R. H. (2014). Analyses of Total Phenolics, Total Flavonoids, and Total Antioxidant Activities in Foods and Dietary Supplements. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 1(25), 305–314. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-52512-3.00058-9>
- Mariaca, C., Zapata, M., & Uribe, P. (2016). *Oxidación y antioxidantes: Hechos y controversias* (pp. 162–174). Revista de la asociación colombiana de dermatología. https://revistasocolderma.org/sites/default/files/oxidacion_y_antioxidantes_hechos_y_controversias.pdf
- Nandagopal, P., Steven, A. N., Chan, L.-W., Rahmat, Z., Jamaluddin, H., & Mohd Noh, N. I. (2021). Bioactive Metabolites Produced by Cyanobacteria for Growth Adaptation and Their Pharmacological Properties. *Biology*, 10(10), 1061. <https://doi.org/10.3390/biology10101061>
- Núñez, M., Marciales, L., & Beltrán, M. (2013). *Microalgas acuáticas: La otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana*. <https://sinchi.org.co/files/publicaciones/publicaciones/pdf/Microalgas%20relo ad.pdf>
- Rahman, Md. M., Islam, Md. B., Biswas, M., & Khurshid Alam, A. H. M. (2015). In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of different parts of *Tabebuia pallida* growing in Bangladesh. *BMC Research Notes*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1618-6>
- Rahman, N. A., Katayama, T., Wahid, M. E. A., Kasan, N. A., Khatoon, H., Yamada,



- Y., & Takahashi, K. (2020). Taxon- and Growth Phase-Specific Antioxidant Production by Chlorophyte, Bacillariophyte, and Haptophyte Strains Isolated From Tropical Waters. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.581628>
- Randrianarison, G., & Ashraf, M. A. (2017). Microalgae: a potential plant for energy production. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 1(2), 104–120. <https://doi.org/10.1080/24749508.2017.1332853>
- Rezayian, M., Niknam, V., & Ebrahimzadeh, H. (2019). Oxidative damage and antioxidative system in algae. *Toxicology Reports*, 6(25), 1309–1313. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.001>
- Sánchez, D. S. (2021). *Influencia de la deficiencia de nutrientes (C, N, P) en la remoción de diclofenaco por las microalgas Chlorella vulgaris, Nannochloropsis oculata, Scenedesmus acutus, Scenedesmus obliquus, Chlamydomonas reinhardtii CC137 y CC1731* [Tesis de pregrado]. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/7380/Tesis.FCQ.2021.Influencia.S%C3%A1nchez.PDF%20%28Versi%C3%B3n%20p%C3%ABlica%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sansone, C., & Brunet, C. (2019). Promises and Challenges of Microalgal Antioxidant Production. *Antioxidants*, 8(7), 199. <https://doi.org/10.3390/antiox8070199>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. In www.intechopen.com. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/66259>
- Scholz, M. J., Weiss, T. L., Jinkerson, R. E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz, M. C., & Gerken, H. G. (2014). Ultrastructure and Composition of the Nannochloropsis gaditana Cell Wall. *Eukaryotic Cell*, 13(11), 1450–1464. <https://doi.org/10.1128/ec.00183-14>
- Singh, D. P., Prabha, R., Verma, S., Meena, K. K., & Yandigeri, M. (2017). Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria. *3 Biotech*, 7(2). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0786-6>
- Sukarni, N., Sudjito, G., Hamidi, N., Yanuhar, U., & Wardana, I. (2014). Potential



and properties of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* as biomass fuel feedstock. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 5(4), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s40095-014-0138-9>

Tan, B. F., Te, S. H., Boo, C. Y., Gin, K. Y.-H., & Thompson, J. R. (2016). Insights from the draft genome of the subsection V (Stigonematales) cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. Strain MRB220 associated with 2-MIB production. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0175-5>

Universidad de Cuenca (2018). *Procedimiento Normalizado de Trabajo de Elaboración de placas TLC* (OG 015).

Universidad de Cuenca. (2019). *Procedimiento Normalizado de Trabajo de Obtención de extractos de microalgas* (OG 002).

Ugya, A. Y., Ari, H. A., & Hua, X. (2021). Microalgae biofilm formation and antioxidant responses to stress induce by *Lemna minor* L., *Chlorella vulgaris*, and *Aphanizomenon flos-aquae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221(9), 112468. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112468>

Woitzik, D., Weckesser, J., & Jurgens, U. (2012). Isolation and Characterization of Cell Wall Components of the Unicellular Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6307. *Journal of General Microbiology*, 134(6), 61–70.

Zakariah, N. A., Rahman, N. Abd., Hamzah, F., Jahi, T. M., & Ismail, A. (2016). *Nannochloropsis Oculata* Algae As Biofuels: A Review On Two-Stage Culture. *Environmental Science and Sustainable Development*, 5(19). https://doi.org/10.1142/9789814723039_0029

Zamora, F. (2017). Estandarización de la metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales. <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/27901/3/Tesis.pdf>

**ANEXOS****Anexo 1. Preparación del medio de cultivo WC**

Componentes	Solución stock
CuSO ₄ .5H ₂ O	10 g en 1 L de agua destilada
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g en 1 L de agua destilada
CoCl ₂ .6H ₂ O	10 g en 1 L de agua destilada
MnCl ₂ .4H ₂ O	180 g en 1 L de agua destilada
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	6 g en 1 L de agua destilada

Para preparar 950 mL de la solución madre de traza de metales se necesita:

Componentes	Solución stock
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	4.36 g en 1 L de agua destilada
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 g en 1 L de agua destilada
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1 mL
CoCl ₂ .6H ₂ O	1 mL
MnCl ₂ .4H ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1 mL
H ₃ BO ₃	1 mL

Además, se requiere una solución de vitaminas, que se prepara de la siguiente manera:

Componentes	Solución stock
Biotina (Vitamina B7)	0.5 g en 1 L de agua destilada
Cianocobalamina	0.5 g en 1 L de agua destilada

**Anexo 2. Resultados de las concentraciones de cada muestra para cada ensayo (DPPH, FRAP, ABTS y Polifenoles Totales).**

Microalga	Estado	Solvente	Polifenoles totales mEq. Ác. Gálico/mL extracto	FRAP mEq Trolox/mL extracto	ABTS mEq Trolox/mL de extracto	DPPH mEq Trolox/mL de extracto
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07250	379.7	860.5	475.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07292	384.7	852.2	470.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07521	397.2	850.5	470.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07105	362.2	828.8	545.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.06979	344.7	827.2	470.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.06938	439.7	823.8	470.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07354	362.2	798.8	385.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07458	412.2	810.5	450.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH	0.07458	359.7	818.8	445.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05004	552.2	537.2	65.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05024	517.2	545.5	115.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05045	534.7	510.5	45.00
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05066	544.7	477.2	105.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05046	484.7	493.8	65.00



<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05004	549.7	478.8	95.00
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05004	552.2	507.2	150.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05066	584.7	518.8	150.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH	0.05045	589.7	487.2	215.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.05856	279.7	373.8	830.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06002	357.2	382.2	795.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06023	322.2	355.5	765.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06189	337.2	342.2	835.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06189	342.2	362.2	765.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06106	354.7	358.8	800.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.05960	314.7	353.8	830.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.06002	314.7	380.5	875.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.05856	409.7	377.2	900.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01364	337.2	15.50	315.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01364	377.2	42.17	310.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01364	459.7	0.5000	235.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01385	394.7	25.50	300.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01364	369.7	40.50	300.0



<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01343	394.7	0.5000	255.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01260	294.7	25.50	265.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01322	272.2	78.83	315.0
<i>Hapalosiphon sp.</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.01322	292.2	50.50	315.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01863	354.7	2.167	395.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01842	349.7	5.500	395.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01925	367.2	30.50	380.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01842	372.2	0.5000	430.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01821	339.7	0.5000	400.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01863	422.2	3.8333	340.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01884	392.2	0.5000	85.00
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01925	417.2	8.833	80.00
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH	0.01946	447.2	7.167	160.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02653	609.7	790.5	320.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02674	632.2	788.8	355.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02695	642.2	795.5	340.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02653	579.7	865.5	410.0



<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02799	624.7	870.5	375.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02716	592.2	873.8	390.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02529	584.7	875.5	440.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02549	612.2	878.8	435.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH	0.02695	692.2	880.5	350.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01135	294.7	407.2	360.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01093	319.7	410.5	330.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01114	364.7	428.8	285.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01156	337.2	453.8	380.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01093	349.7	472.2	335.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01177	364.7	473.8	315.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01156	329.7	432.2	345.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01135	304.7	443.8	355.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Fresca	MeOH-H ₂ O	0.01135	324.7	450.5	310.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03756	422.2	477.2	210.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03756	457.2	512.2	380.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03776	492.2	505.5	345.0



<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03568	509.7	467.2	310.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03672	642.2	480.5	320.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03735	624.7	467.2	325.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03652	554.7	502.2	330.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03693	519.7	517.2	285.0
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Liofilizada	MeOH-H ₂ O	0.03672	502.2	522.2	108.5



Anexo 3. Resultados del análisis estadístico del ensayo DPPH obtenido en Infostat®

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	Aj	CV
DPPH mEq Trolox	72	0.90	0.89	18.43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2691604.94	7	384514.99	81.12	<0.0001
Microalga	168345.03	1	168345.03	35.52	<0.0001
Estado	804651.84	1	804651.84	169.76	<0.0001
Solvente	265052.67	1	265052.67	55.92	<0.0001
Microalga*Estado	958766.28	1	958766.28	202.28	<0.0001
Microalga*Solvente	385954.34	1	385954.34	81.43	<0.0001
Estado*Solvente	105915.03	1	105915.03	22.35	<0.0001
Microalga*Estado*Solvente	2919.75	1	2919.75	0.62	0.4354
Error	303349.22	64	4739.83		
Total	2994954.16	71			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=32.41768

Error: 4739.8316 gl: 64

Microalga	Medias	n	E.E.
MAAL 15	325.24	36	11.47 A
MAAL 24	421.94	36	11.47 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=32.41768

Error: 4739.8316 gl: 64

Estado	Medias	n	E.E.
Liofilizada	267.88	36	11.47 A
Fresca	479.31	36	11.47 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=32.41768

Error: 4739.8316 gl: 64

Solvente	Medias	n	E.E.
MeOH	312.92	36	11.47 A



MEOH-H2O	434.26	36	11.47	B
----------	--------	----	-------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=60.53526

Error: 4739.8316 gl: 64

Microalga	Estado	Medias	n	E.E.	
MAAL 24	Liofilizada	200.83	18	16.23	A
MAAL 15	Fresca	315.56	18	16.23	B
MAAL 15	Liofilizada	334.92	18	16.23	B
MAAL 24	Fresca	643.06	18	16.23	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=60.53526

Error: 4739.8316 gl: 64

Microalga	Solvente	Medias	n	E.E.	
MAAL 24	MeOH	288.06	18	16.23	A
MAAL 15	MEOH-H2O	312.69	18	16.23	A
MAAL 15	MeOH	337.78	18	16.23	A
MAAL 24	MEOH-H2O	555.83	18	16.23	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=60.53526

Error: 4739.8316 gl: 64

Estado	Solvente	Medias	n	E.E.	
Liofilizada	MeOH	245.56	18	16.23	A
Liofilizada	MEOH-H2O	290.19	18	16.23	A
Fresca	MeOH	380.28	18	16.23	B
Fresca	MEOH-H2O	578.33	18	16.23	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=101.69182

Error: 4739.8316 gl: 64

Microalga	Estado	Solvente	Medias	n	E.E.	
MAAL 24	Liofilizada	MeOH	111.67	9	22.95	A
MAAL 24	Liofilizada	MEOH-H2O	290.00	9	22.95	B
MAAL 15	Liofilizada	MEOH-H2O	290.39	9	22.95	B
MAAL 15	Fresca	MeOH	296.11	9	22.95	B
MAAL 15	Fresca	MEOH-H2O	335.00	9	22.95	B
MAAL 15	Liofilizada	MeOH	379.44	9	22.95	B C
MAAL 24	Fresca	MeOH	464.44	9	22.95	C
MAAL 24	Fresca	MEOH-H2O	821.67	9	22.95	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Anexo 4. Resultados del análisis estadístico del ensayo FRAP obtenido en Infostat®

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FRAP meq Trolox	72	0.86	0.85	10.06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	774399.65	7	110628.52	57.75	<0.0001
Microalga	65401.39	1	65401.39	34.14	<0.0001
Estado	415568.06	1	415568.06	216.95	<0.0001
Solvente	164833.68	1	164833.68	86.05	<0.0001
Microalga*Estado	68142.01	1	68142.01	35.57	<0.0001
Microalga*Solvente	9112.50	1	9112.50	4.76	0.0329
Estado*Solvente	39200.00	1	39200.00	20.46	<0.0001
Microalga*Estado*Solvente	12142.01	1	12142.01	6.34	0.0143
Error	122591.67	64	1915.49		
Total	896991.32	71			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 1915.4948 gl: 64

Microalga	Medias	n	E.E.
MAAL 24	404.96	36	7.29
MAAL 15	465.24	36	7.29

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 1915.4948 gl: 64

Estado	Medias	n	E.E.
Fresca	359.13	36	7.29
Liofilizada	511.07	36	7.29

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 1915.4948 gl: 64

Solvente	Medias	n	E.E.
MEOH-H ₂ O	387.25	36	7.29
MeOH	482.94	36	7.29

**Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones***Error: 1915.4948 gl: 64*

Microalga	Estado	Medias	n	E.E.
MAAL 15	Fresca	358.50	18	10.32
MAAL 24	Fresca	359.75	18	10.32
MAAL 24	Liofilizada	450.17	18	10.32
MAAL 15	Liofilizada	571.97	18	10.32

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones*Error: 1915.4948 gl: 64*

Microalga	Solvente	Medias	n	E.E.
MAAL 24	MEOH-H2O	345.86	18	10.32
MAAL 15	MEOH-H2O	428.64	18	10.32
MAAL 24	MeOH	464.06	18	10.32
MAAL 15	MeOH	501.83	18	10.32

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones*Error: 1915.4948 gl: 64*

Estado	Solvente	Medias	n	E.E.
Fresca	MEOH-H2O	334.61	18	10.32
Fresca	MeOH	383.64	18	10.32
Liofilizada	MEOH-H2O	439.89	18	10.32
Liofilizada	MeOH	582.25	18	10.32

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones*Error: 1915.4948 gl: 64*

Microalga	Estado	Solvente	Medias	n	E.E.
MAAL 15	Fresca	MEOH-H2O	332.25	9	14.59
MAAL 24	Fresca	MEOH-H2O	336.97	9	14.59
MAAL 24	Liofilizada	MEOH-H2O	354.75	9	14.59
MAAL 24	Fresca	MeOH	382.53	9	14.59
MAAL 15	Fresca	MeOH	384.75	9	14.59
MAAL 15	Liofilizada	MEOH-H2O	525.03	9	14.59
MAAL 24	Liofilizada	MeOH	545.58	9	14.59
MAAL 15	Liofilizada	MeOH	618.92	9	14.59



Anexo 5. Resultados del análisis estadístico del ensayo ABTS obtenido en Infostat ®

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ABTS meq Trolox	72	0.99	0.99	5.51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6170116.20	7	881445.17	1499.47	<0.0001
Microalga	3612.51	1	3612.51	6.15	0.0158
Estado	62226.22	1	62226.22	105.86	<0.0001
Solvente	827040.11	1	827040.11	1406.92	<0.0001
Microalga*Estado	2706689.28	1	2706689.28	4604.48	<0.0001
Microalga*Solvente	1177260.47	1	1177260.47	2002.70	<0.0001
Estado*Solvente	714676.08	1	714676.08	1215.77	<0.0001
Microalga*Estado*Solvente	678611.53	1	678611.53	1154.42	<0.0001
Error	37621.61	64	587.84		
Total	6207737.81	71			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=11.41640

Error: 587.8376 gl: 64

Microalga	Medias	n	E.E.	
MAAL 24	433.14	36	4.04	A
MAAL 15	447.31	36	4.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=11.41640

Error: 587.8376 gl: 64

Estado	Medias	n	E.E.	
Fresca	410.82	36	4.04	A
Liofilizada	469.62	36	4.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=11.41640

Error: 587.8376 gl: 64

Solvente	Medias	n	E.E.	
MEOH-H2O	333.05	36	4.04	A



MeOH	547.40	36	4.04	B
------	--------	----	------	---

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=21.31845

Error: 587.8376 gl: 64

Microalga	Estado	Medias	n	E.E.			
MAAL 15	Fresca	224.02	18	5.71	A		
MAAL 24	Liofilizada	268.65	18	5.71		B	
MAAL 24	Fresca	597.63	18	5.71			C
MAAL 15	Liofilizada	670.59	18	5.71			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=21.31845

Error: 587.8376 gl: 64

Microalga	Solvente	Medias	n	E.E.			
MAAL 24	MEOH-H2O	198.09	18	5.71	A		
MAAL 15	MeOH	426.61	18	5.71		B	
MAAL 15	MEOH-H2O	468.00	18	5.71			C
MAAL 24	MeOH	668.19	18	5.71			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=21.31845

Error: 587.8376 gl: 64

Estado	Solvente	Medias	n	E.E.			
Liofilizada	MEOH-H2O	262.81	18	5.71	A		
Fresca	MEOH-H2O	403.28	18	5.71		B	
Fresca	MeOH	418.37	18	5.71		B	
Liofilizada	MeOH	676.43	18	5.71			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=35.81239

Error: 587.8376 gl: 64

Microalga	Estado	Solvente	Medias	n	E.E.		
MAAL 15	Fresca	MeOH	6.61	9	8.08	A	
MAAL 24	Liofilizada	MEOH-H2O	31.06	9	8.08	A	
MAAL 24	Fresca	MEOH-H2O	365.13	9	8.08		B
MAAL 15	Fresca	MEOH-H2O	441.43	9	8.08		C
MAAL 15	Liofilizada	MEOH-H2O	494.57	9	8.08		
D							
MAAL 24	Liofilizada	MeOH	506.24	9	8.08		
D							



MAAL 24	Fresca	MeOH	830.13	9	8.08
	E				
MAAL 15	Liofilizada	MeOH	846.61	9	8.08
	E				

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)



Anexo 6. Resultados del análisis estadístico del ensayo Polifenoles Totales obtenido en Infostat®

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PP meq. Ac. Galic	72	1.00	1.00	2.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	7	4.7E-03	4883.80	<0.0001
Microalga	0.01	1	0.01	12440.44	<0.0001
Estado	1.4E-03	1	1.4E-03	1487.30	<0.0001
Solvente	2.4E-03	1	2.4E-03	2534.43	<0.0001
Microalga*Estado	0.01	1	0.01	12362.30	<0.0001
Microalga*Solvente	3.1E-03	1	3.1E-03	3204.45	<0.0001
Estado*Solvente	5.0E-05	1	5.0E-05	52.45	<0.0001
Microalga*Estado*Solvente	2.0E-03	1	2.0E-03	2105.22	<0.0001
Error	6.1E-05	64	9.6E-07		
Total	0.03	71			

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Microalga	Medias	n	E.E.
MAAL 15	0.02	36	1.6E-04
MAAL 24	0.05	36	1.6E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Estado	Medias	n	E.E.
Liofilizada	0.03	36	1.6E-04
Fresca	0.04	36	1.6E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Solvente	Medias	n	E.E.
MEOH-H ₂ O	0.03	36	1.6E-04
MeOH	0.04	36	1.6E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones



Error: 0.0000 gl: 64

Microalga	Estado	Medias	n	E.E.
MAAL 15	Fresca	0.02	18	2.3E-04
MAAL 15	Liofilizada	0.03	18	2.3E-04
MAAL 24	Liofilizada	0.03	18	2.3E-04
MAAL 24	Fresca	0.07	18	2.3E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Microalga	Solvente	Medias	n	E.E.
MAAL 15	MeOH	0.02	18	2.3E-04
MAAL 15	MEOH-H2O	0.02	18	2.3E-04
MAAL 24	MEOH-H2O	0.04	18	2.3E-04
MAAL 24	MeOH	0.06	18	2.3E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Estado	Solvente	Medias	n	E.E.
Liofilizada	MEOH-H2O	0.03	18	2.3E-04
Fresca	MEOH-H2O	0.04	18	2.3E-04
Liofilizada	MeOH	0.04	18	2.3E-04
Fresca	MeOH	0.05	18	2.3E-04

Medias ajustadas, error estándar y número de observaciones

Error: 0.0000 gl: 64

Microalga	Estado	Solvente	Medias	n	E.E.
MAAL 15	Fresca	MEOH-H2O	0.01	9	3.3E-04
MAAL 24	Liofilizada	MEOH-H2O	0.01	9	3.3E-04
MAAL 15	Fresca	MeOH	0.02	9	3.3E-04
MAAL 15	Liofilizada	MeOH	0.03	9	3.3E-04
MAAL 15	Liofilizada	MEOH-H2O	0.04	9	3.3E-04
MAAL 24	Liofilizada	MeOH	0.05	9	3.3E-04
MAAL 24	Fresca	MEOH-H2O	0.06	9	3.3E-04
MAAL 24	Fresca	MeOH	0.07	9	3.3E-04