



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Actividad antioxidante en aceites comestibles de extractos de algas del caribe colombiano obtenidos mediante extracción supercrítica

Mónica Yaneth Ospina

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2016

Actividad antioxidante en aceites comestibles de extractos de algas del caribe colombiano obtenidos mediante extracción supercrítica

Mónica Yaneth Ospina

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Químico, Doctor en Ciencias Químicas. Fabián Parada Alfonso

Codirectora:

Química, Magíster en Ciencias Biológicas. Gladys Rozo

Línea de Investigación:

Química Agroalimentaria

Grupo de investigación:

Estudio de los cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C., Colombia

2016

*A mi mamá, hermanos y sobrinos por la
paciencia, compañía y colaboración brindada.*

*A Argemiro por impulsarme a alcanzar lo que
a veces parece lejano.*

*A todos los que me apoyaron intelectual, moral
y económicamente para hacer posible este
trabajo.*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, a la Facultad de Ciencias, a la Facultad de Agronomía, al Departamento de Química, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA.

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá, por su apoyo para la obtención de las muestras y de algunos materiales y reactivos.

A la Universidad Nacional de Colombia, por el apoyo económico al proyecto, mediante la «Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015» (Proyecto con códigos HERMES 28547 y QUIPU 201010023413).

A Colciencias por el apoyo económico a través del programa Jóvenes Investigadores. Convenio Especial de Cooperación 0200 del 30 de agosto de 2014, de la convocatoria de Colciencias No. 645 «Convocatoria Nacional Jóvenes Investigadores e Innovadores año 2014».

A la Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres por el apoyo económico en el momento en que más lo necesitaba.

Al profesor Fabián Parada, por todo el apoyo y enseñanzas no sólo académicas, sino de vida, por todos los momentos compartidos y su paciencia.

Al profesor Luis Ignacio Rodríguez, por su disposición y constante colaboración con el equipo de fluidos presurizados.

A los estadísticos Oscar Ayala, Julián Rodríguez, Jairo Pedraza, Francisco Lara, Jorge Caro y al profesor Enrique Darghan, por la asesoría prestada en los análisis estadísticos.

A la empresa Team Foods de Colombia, por donar el aceite idóneo para la presente investigación.

A todos los integrantes del grupo de investigación: “Estudio de cambios químicos y bioquímicos de alimentos frescos y procesados”, por sus continuos aportes y compañía para llevar a cabo este trabajo. Los profesores: Patricia, Laura, Cecilia, Carlos y Fabián. Los compañeros: Henry, Mauricio, Diego, Paola, Wilson, Elizabeth, Eliana, Mayra, Clara, Katherine, Mary, Gaby y Luis.

A Henry, Gaby, Ibeth y Luis porque además de su colaboración, construimos una amistad que ha sido muy enriquecedora para mí.

Resumen

En el presente trabajo, se evaluó la posibilidad de emplear dos algas del caribe colombiano, *Hypnea musciformis* y *Gracilaria mammillaris*, como fuente de extractos con actividad antioxidante (AA), en aceites comestibles. Los extractos de *H. musciformis* y *G. mammillaris* se obtuvieron mediante extracción con fluidos supercríticos (EFS) y extracción Soxhlet a presión reducida (ESPr). La EFS se aplicó usando CO₂ a diferentes condiciones de presión y temperatura (10, 20 y 30 MPa; 40, 50 y 60 °C) con etanol como cosolvente (2, 5 y 8%, p/p). Para obtener los ESPr se emplearon los disolventes hexano, acetato de etilo y etanol. La actividad antioxidante fue evaluada mediante ensayo de oxidación acelerada en un aceite vegetal comestible, midiendo el contenido de hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL) y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Además, se determinó el contenido total de fenoles y de carotenos y la correlación de dichos contenidos con la AA.

Los extractos obtenidos a 30 MPa, 60 °C y 8% de ETOH, presentaron la mayor AA en las dos algas, superando la protección ofrecida por los ESPr y por el butilhidroxitolueno (BHT). El extracto de *H. musciformis* inhibió en 35% los HPL y en 31% los TBARS, y el de *G. mammillaris* inhibió en 23% los HPL y en 42% los TBARS. De acuerdo a las superficies de respuesta, los mayores niveles evaluados de etanol y de presión en los EFS, ejercieron la mayor influencia en la obtención de antioxidantes. Sin embargo, no se encontró correlación lineal entre la AA y el contenido total de fenoles y de carotenos.

Palabras clave: *Hypnea musciformis*, *Gracilaria mammillaris*, actividad antioxidante, extracción con fluidos supercríticos, extracción Soxhlet, oxidación acelerada de aceites.

Abstract

In this work were obtained antioxidant extracts from two seaweeds (*Hypnea musciformis* and *Gracilaria mammillaris*) by supercritical fluid technology. Antioxidant activity (AA) of the extracts obtained by supercritical fluid extraction (SFE) were compared with extracts obtained by Soxhlet extraction under reduced pressure (SEPr). The SFE was applied using CO₂ at different conditions of pressure and temperature (10, 20, 30 MPa; 40, 50, 60°C) with ethanol as a co-solvent (2, 5, 8%, p/p). In order to obtain the extracts by SEPr the solvents hexane, ethyl acetate and ethanol were used. The antioxidant activity was evaluated by accelerated oxidation assay in edible vegetable oil, it was measured by mean of the determination of content of hydroperoxide linoleic acid (HPL) and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) produced them. Additionally, the total content of phenols and carotenoids were measured too.

In both seaweed, the extract obtained at 30 MPa, 60 °C and 8% EtOH showed the highest AA, the extracts of *H. musciformis* inhibited HPL in 35% and TBARS in 31% and *G. mammillaris* extracts inhibited HPL in 23% and TBARS in 42%, these surpassing the protection afforded by SEPr and butylhydroxytoluene (BHT). According to the response surfaces, the highest levels of ethanol and pressure of the SFE exerted the greatest influence over the antioxidants activity. However, it was not found linear correlation between AA and total phenol and carotene content.

Keywords: *Hypnea musciformis*, *Gracilaria mammillaris*, antioxidant activity, supercritical fluid extraction, Soxhlet extraction, accelerated oxidation of oils.

Contenido

Resumen	I
Abstract	II
Lista de figuras	V
Lista de tablas	VII
1. Marco teórico	15
1.1 Algas.....	15
1.1.1 Macronutrientes y micronutrientes de las macroalgas.....	16
1.1.2 Actividad antioxidante en las macroalgas	19
▪ Carotenoides y otros pigmentos en macroalgas	20
▪ Compuestos fenólicos en macroalgas	22
1.1.3 <i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamoroux	23
1.1.4 <i>Gracilaria mammillaris</i> (Montagne) M.A. Howe	24
1.1.5 Antecedentes de la actividad antioxidante de las macroalgas.....	25
1.2 Oxidación en alimentos	28
1.2.1 Antioxidantes	30
1.2.2 Clasificación de los antioxidantes	31
1.2.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante.....	33
1.3 Extracción con fluidos supercríticos.....	36
1.3.1 Ventajas de EFS.....	38
1.4 Extracción Soxhlet.....	40
2. Planteamiento del problema	41
Objetivos	44
2.1 Objetivo general	44
2.2 Objetivos específicos	44
3. Metodología	45
3.1 Obtención y preparación de las biomásas	46
3.2 Obtención de extractos.....	47
3.2.1 Extracción con fluidos supercríticos	47
3.2.2 Extracción Soxhlet.....	49
3.3 Actividad antioxidante en aceite vegetal comestible	50
3.3.1 Oxidación acelerada del aceite vegetal comestible.....	50
3.3.2 Medida de hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL).....	51

3.3.3	Medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico	52
3.4	Contenido total de fenoles (CTF).....	53
3.5	Contenido total de caroteno (CTC).....	53
3.6	Diseño experimental y análisis estadístico	54
4.	Resultados y análisis	56
4.1	Resultados para el alga <i>G. mammillaris</i>	56
4.1.1	Curva de extracción con fluidos supercríticos	56
4.1.2	Actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFS y ESPr.....	58
4.1.3	Rendimiento de extracción	68
4.1.4	Contenido total de fenoles	73
4.1.5	Contenido total de carotenos	78
4.1.6	Estudio de correlación de la AA con el CTF y CTC.....	83
4.2	Resultados para el alga <i>H. musciformis</i>	86
4.2.1	Curva de extracción con fluidos supercríticos	86
4.2.2	Actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFS y ESPr.....	87
4.2.3	Rendimiento de extracción	96
4.2.4	Contenido total de fenoles	102
4.2.5	Contenido total de carotenos	106
4.2.6	Estudio de correlación de la AA con el CTF y CTC.....	110
4.3	Comparación de los resultados obtenidos entre los extractos de las dos algas 111	
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	115
5.1	Conclusiones.....	115
5.2	Recomendaciones.....	117
	Bibliografía	118

Lista de figuras

Figura 1-1. Imagen del alga <i>H. musciformis</i>	23
Figura 1-2. Imagen del alga <i>G. mammillaris</i>	24
Figura 1-3. Reacción del ácido 2-tiobarbiturico (TBA) y malondialdehído (MDA)	35
Figura 1-4. Diagrama de fases para el dióxido de carbono	36
Figura 2-1. Esquema general de la metodología	46
Figura 2-2. Diagrama del equipo de extracción con fluidos supercríticos.....	48
Figura 2-3. Metodología de extracción Soxhlet a presión reducida.....	50
Figura 2-4. Diseño central compuesto para tres factores a tres niveles -1, 0, +1.....	54
Figura 3-1. Cinética de extracción con el alga <i>G. mammillaris</i> a 30 MPa, 50°C y 5% EtOH.....	57
Figura 3-2. Efecto estandarizado de los factores de EFS en la AA de <i>G. mammillaris</i>	62
Figura 3-3. Superficies de respuesta para el % de inhibición de HPL versus factores de EFS con <i>G. mammillaris</i>	63
Figura 3-4. Superficies de respuesta para el % de inhibición de TBARS versus factores de EFS con <i>G. mammillaris</i>	64
Figura 3-5. Porcentaje de inhibición de HPL y TBARS con extractos de <i>G. mammillaris</i>	68
Figura 3-6. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el % p/p de rendimiento (bs) de <i>G. mammillaris</i>	70
Figura 3-7. Superficies de respuesta del % de rendimiento versus factores de extracción EFS con <i>G. mammillaris</i>	71
Figura 3-8. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTF de <i>G. mammillaris</i> ..	76
Figura 3-9. Superficies de respuesta del CTF versus factores de EFS con <i>G. mammillaris</i>	77
Figura 3-10. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTC de <i>G. mammillaris</i>	80
Figura 3-11. Superficies de respuesta del CTC versus factores de EFS con <i>G. mammillaris</i>	81
Figura 3-12. Curva de extracción con el alga <i>H. musciformis</i> a 30 MPa, 50°C y 5% EtOH.....	86
Figura 3-13. Efecto estandarizado de los factores de EFS en la AA de <i>H. musciformis</i> ..	91
Figura 3-14. Superficies de respuesta para el % de inhibición de HPL versus factores de EFS con <i>H. musciformis</i>	91

Figura 3-15. Superficies de respuesta para el % de inhibición de TBARS versus factores de EFS con <i>H. musciformis</i>	92
Figura 3-16. Porcentaje de inhibición de HPL y TBARS con extractos de <i>H. musciformis</i>	96
Figura 3-17. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el % p/p de rendimiento (bs) de <i>H. musciformis</i>	100
Figura 3-18. Superficies de respuesta del % de rendimiento versus factores de EFS con <i>H. musciformis</i>	101
Figura 3-19. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTF de <i>H. musciformis</i>	105
Figura 3-20. Superficies de respuesta del CTF versus factores de EFS con <i>H. musciformis</i>	105
Figura 3-21. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTC de <i>H. musciformis</i>	108
Figura 3-22. Superficies de respuesta del CTC versus factores de EFS con <i>H. musciformis</i>	109
Figura 3-23. Comparación de los % de inhibición de HPL y TBARS ofrecidos por extractos de las algas (1) <i>G. mammillaris</i> (2) <i>H. musciformis</i>	112
Figura 3-24. Comparación del porcentaje de rendimiento de algunos extractos de las algas <i>H. musciformis</i> y <i>G. mammillaris</i>	113
Figura 3-25. Comparación del CTF de algunos extractos de las algas <i>H. musciformis</i> y <i>G. mammillaris</i>	113
Figura 3-26. Comparación del CTC de algunos extractos de las algas <i>H. musciformis</i> y <i>G. mammillaris</i>	114

Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 1-1. Propiedades supercríticas de algunos compuestos comúnmente usados como fluidos supercríticos.....	37
Tabla 2-1. Condiciones de extracción empleadas con Soxhlet a presión reducida.....	49
Tabla 2-2. Diseño experimental de EFS.....	55
Tabla 3-1. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con EFS de <i>G. mamillaris</i> y antioxidantes sintéticos.....	59
Tabla 3-2. Diferencias estadísticas de producción de HPL con EFS de <i>G. mamillaris</i>	60
Tabla 3-3. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con EFS de <i>G. mamillaris</i>	61
Tabla 3-4. Niveles de los factores que maximizan el % de inhibición en la región experimental estudiada.	65
Tabla 3-5. Trayectoria de máximo ascenso en el % de inhibición con extractos de <i>G. mamillaris</i>	65
Tabla 3-6. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con extractos Soxhlet de <i>G. mamillaris</i> y antioxidantes sintéticos.....	66
Tabla 3-7. Diferencias estadísticas de producción de HPL con extractos Soxhlet de <i>G. mamillaris</i>	67
Tabla 3-8. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con extractos Soxhlet de <i>G. mamillaris</i>	67
Tabla 3-9. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>G. mamillaris</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet.	69
Tabla 3-10. Niveles de los factores de EFS que maximizan el porcentaje de rendimiento en la región experimental estudiada.	72
Tabla 3-11. Trayectoria de máximo ascenso en el rendimiento de EFS de <i>G. mamillaris</i>	73
Tabla 3-12. CTF de los extractos de <i>G. mamillaris</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet.	74
Tabla 3-13. CTF reportado en la literatura para EFS de macroalgas.	75
Tabla 3-14. CTF reportado en la literatura para extracción con técnicas convencionales de macroalgas del género <i>Gracilaria</i>	75
Tabla 3-15. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTF en la región experimental estudiada.	77
Tabla 3-16. Trayectoria de máximo ascenso en el CTF de EFS de <i>G. mamillaris</i>	78

Tabla 3-17. CTC de los extractos de <i>G. mammillaris</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet.	79
Tabla 3-18. CTC reportado en la literatura para algunas macroalgas.	80
Tabla 3-19. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTC en la región experimental estudiada.	82
Tabla 3-20. Trayectoria de máximo ascenso en el CTC de EFS de <i>G. mammillaris</i>	82
Tabla 3-21. Valores de R ² mediante correlación lineal (1) EFS (2) ESPr.....	83
Tabla 3-22. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con EFS de <i>H. musciformis</i> y antioxidantes sintéticos.....	88
Tabla 3-23. Diferencias estadísticas de producción de HPL con EFS de <i>H. musciformis</i>	89
Tabla 3-24. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con EFS de <i>H. musciformis</i>	90
Tabla 3-25. Niveles de los factores que maximizan el % de inhibición en la región experimental estudiada.	92
Tabla 3-26. Trayectoria de máximo ascenso en el % de inhibición con extractos de <i>H. musciformis</i>	93
Tabla 3-27. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con extractos Soxhlet del alga <i>H. musciformis</i> y antioxidantes sintéticos.	94
Tabla 3-28. Diferencias estadísticas de producción de HPL con extractos Soxhlet de <i>H. musciformis</i>	95
Tabla 3-29. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con extractos Soxhlet de <i>H. musciformis</i>	95
Tabla 3-30. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>H. musciformis</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet.	98
Tabla 3-31. Porcentajes de rendimiento reportados en la literatura con técnicas de extracción convencionales.....	99
Tabla 3-32. Niveles de los factores de EFS que maximizan el porcentaje de rendimiento en la región experimental estudiada.	101
Tabla 3-33. Trayectoria de máximo ascenso en el rendimiento de EFS de <i>H. musciformis</i>	102
Tabla 3-34. CTF de los extractos de <i>H. musciformis</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet.	103
Tabla 3-35. CTF reportado en la literatura para <i>H. musciformis</i>	104
Tabla 3-36. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTF en la región experimental estudiada.	106
Tabla 3-37. Trayectoria de máximo ascenso en el CTF de extractos EFS de <i>H. musciformis</i>	106
Tabla 3-38. CTC de los extractos de <i>H. musciformis</i> obtenidos mediante EFS y Soxhlet	107
Tabla 3-39. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTC en la región experimental estudiada.	109
Tabla 3-40. Trayectoria de máximo ascenso en el CTC de EFS de <i>H. musciformis</i>	110
Tabla 3-41. Valores de R ² mediante correlación lineal para EFS (1) y para ESPr (2)....	110

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AA	Actividad antioxidante
AE	Acetato de etilo
AG	Ácido galico
ANOVA	Análisis de varianzas
Aox	Antioxidante
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CE	Curva de extracción
CER	Etapas de tasa constante de extracción (Constant extraction rate)
CO ₂ SC	Dióxido de carbono supercrítico
CO ₂ /EtOH	Dióxido de carbono con etanol como cosolvente
CO ₂	Dióxido de carbono
CTC	Contenido total de beta-caroteno
CTF	Contenido total de fenoles
DC	Dieno conjugado
DCP	Etapas difusional o de extracción nula (Diffusion-controlled period)
DE	Desviación estándar
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ESPr	Extracción soxhlet a presión reducida
EFS	Extracción con fluidos supercríticos
EROs	Especies reactivas del oxígeno
EtOH	Etanol
FER	Etapas de tasa extracción decreciente (Falling extraction rate)
FS	Fluidos supercríticos
<i>G. mammillaris</i>	<i>Gracilaria mammillaris</i> (Montagne) M.A. Howe
GRAS	Generalmente reconocido como seguro (Generally recognized as safe)
<i>H. musciformis</i>	<i>Hypnea musciformis</i> (Wulfen) Lamoroux
HPL	Hidroperóxidos del ácido linoléico
MDA	Malondialdehído
P _C	Presión crítica
P _R	Presión reducida
RBD	Refinado, blanqueado y desodorizado (aceite)

SD	Desviación estándar
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terbutil-Hidroxiquinona
T _c	Temperatura crítica
TCA	Ácido tricloroacético
UVR	Radiación de energía ultravioleta

Introducción

Los antioxidantes provenientes de fuentes naturales, han despertado gran interés en grupos de investigación multidisciplinarios de las áreas farmacéutica, cosmética, médica y alimenticia. Los antioxidantes presentes en los alimentos, se consideran eficientes para prevenir, retrasar o detener procesos oxidativos de los mismos y de quien los consume (Álvarez et al., 2010). Los antioxidantes presentes en los alimentos se consideran seguros para la salud del consumidor, comparados con los antioxidantes sintéticos, para algunos de los cuales se ha reportado efectos negativos para la salud, por la toxicidad que presentan (Polat et al., 2013; Thompson, et al., 1988). Los antioxidantes naturales son producidos por el metabolismo de algunos seres vivos, dentro de los cuales cabe destacar los vegetales y organismos marinos. Las principales biomoléculas activas que los componen corresponden a compuestos fenólicos, carotenoides y algunas vitaminas, cuya contribución a la actividad antioxidante, no sólo depende de su concentración, sino de las interacciones que se dan entre ellos, lo cual se conoce como sinergismo (Castro, 2013; Fernández et al., 2011).

El daño oxidativo en alimentos, se evidencia por la pérdida de cualidades sensoriales, valor nutricional y disminución de vida útil. En los animales, el daño a moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos se ha visto relacionado con procesos degenerativos y patológicos, principalmente en enfermedades cardiovasculares, neurológicas y cáncer (Pokorny et al., 2001; Rodríguez et al., 2001). Para evitar, retrasar o detener el daño oxidativo, la industria alimentaria propende por la inclusión de antioxidantes en sus productos, los cuales en su mayoría son de origen sintético. Para la obtención de antioxidantes naturales se pretenden emplear extractos o compuestos inocuos, garantizando atributos sensoriales, cualidades nutricionales y seguridad de los alimentos por más tiempo (Gupta et al., 2011).

La búsqueda de fuentes naturales de antioxidantes, ha llevado a investigar diferentes biomásas de origen vegetal terrestre y marino. En este último caso, las algas han sido de interés, debido a la estabilidad que presentan frente a la oxidación, a pesar de estar expuestas a condiciones marinas de estrés, como la luz, rápidas fluctuaciones de temperatura, estrés osmótico y disecación (Gupta, 2011). Estas condiciones fácilmente producirían daño oxidativo en sustratos susceptibles, pero las algas marinas tienen poca afectación, por lo que se supone poseen mecanismos y compuestos de protección (Batista, et al., 2009; Morales, et al., 2010). Dependiendo de la especie, las algas presentan en su composición antioxidantes tales como compuestos fenólicos, derivados clorofílicos, terpenoides y pigmentos carotenoides, capaces de absorber radiaciones UV (Batista et al., 2009; El Gamal, 2010; Gupta, 2011). En las algas rojas se han encontrado compuestos fenólicos halogenados, polisacáridos sulfatados y carotenoides (Blunt et al., 2014; das Chagas Faustino Alves et al., 2011; Stengel et al., 2011). Éstos han demostrado capacidad para captar radicales libres, quelar metales pro-oxidantes, aceptar y donar electrones, frenar la peroxidación lipídica e inactivar especies reactivas del oxígeno (EROs) (Batista et al., 2009). Lo anterior demuestra que las algas son fuentes promisorias de compuestos con actividad antioxidante (AA), los cuales podrían ser empleados como agentes protectores contra procesos oxidativos en diferentes sistemas.

La algas de interés para el presente trabajo son las algas comestibles *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux y *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe, ampliamente distribuidas en las costas de los océanos Atlántico, Índico y Pacífico (Schmidt et al., 2012). En Colombia estas algas se encuentran en el litoral Caribe, en la Guajira y el Magdalena (Camacho et al., 2012). Dichas algas son comercialmente explotadas por su contenido de ficocoloides tales como kappa-carragenina y agar-agar, polisacáridos empleados en alimentos por su poder gelificante, espesante, agentes de suspensión y estabilizantes (Camacho et al., 2012; Cosenza et al., 2014; das Chagas Faustino Alves et al., 2011; Schmidt et al., 2012). Aunque existen reportes de estas algas como fuentes de antioxidantes, especialmente de *H. musciformis* (Chakraborty, Joseph, & Praveen, 2013; Pina, Costa, Lage-Yusty, & López-Hernández, 2014; Xu et al., 2015), éstas no se explotan comercialmente como fuente de dichos compuestos, sin embargo son consumidas en varias zonas costeras del mundo.

La obtención de extractos con AA a partir de fuentes naturales, con potencial uso en los ámbitos alimentario, médico, farmacéutico y cosmético, se ha desarrollado con el uso de nuevas técnicas, las cuales rempazan a las extracciones convencionales que requieren gran cantidad de disolventes orgánicos, tiempo y energía (p.e. soxhlet, hidrodestilación y maceración). En este sentido, técnicas alternativas de extracción, como la extracción con fluidos supercríticos (EFS), han venido ganando más aceptación y popularidad. Esto se debe a que dicha técnica presenta ventajas sobre las convencionales, menor tiempo de extracción y bajo consumo de disolvente, baja o nula toxicidad, extractos libres de disolventes y de trasgresiones térmicas, bajo impacto sobre el medio ambiente, entre muchas otras (Grosso, Valentão, Ferreres, & Andrade, 2015; Miguel Herrero, Sánchez-Camargo, Cifuentes, & Ibáñez, 2015; Mahdi, Rahimi-nasrabadi, & Somayyeh, 2014).

En el presente trabajo se evaluaron las algas rojas *H. musciformis* y *G. mammillaris* como fuente de extractos con actividad antioxidante en un aceite vegetal comestible. Dichos extractos fueron obtenidos mediante EFS y extracción Soxhlet a presión reducida (ESPr). La EFS se realizó con CO₂ como disolvente, variando la presión y temperatura de extracción (10, 20 y 30 Mpa; 40, 50 y 60 °C) y se adicionó etanol como cosolvente (2, 5 y 8%, p/p), con el fin de determinar la influencia de estas variables sobre la AA. Para la ESPr, se empleó hexano, acetato de etilo y etanol, mediante extracciones sucesivas, con el fin de obtener extractos de diferente polaridad. La AA de los extractos obtenidos se evaluó en un aceite vegetal comestible libre de antioxidantes (mezcla de aceite de Soya con 30% de oleína de palma), mediante ensayo de oxidación acelerada. El efecto protector de dichos extractos frente a la oxidación lipídica, se midió por cuantificación de hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL) y especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y se comparó con la protección ofrecida por los antioxidantes de origen sintético butilhidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroquinona (TBHQ), y ácido gálico (AG). Adicionalmente, se determinó el contenido total de fenoles (CTF) y el contenido total de carotenoides (CTC) en los extractos y se correlacionó con su AA.

1. Marco teórico

1.1 Algas

Las algas son organismos polifiléticos, es decir, alejados entre sí por líneas de evolución paralela, lo cual hace que su composición química, morfología, desarrollo y reproducción difieran bastante entre sí. Debido a que no poseen raíces, hojas o tejidos vasculares, no se les considera como plantas, sino pertenecientes al reino protista, aunque realicen la fotosíntesis (Díaz et al., 2003; Stengel et al., 2011). Sus individuos se encuentran principalmente en los dominios Eucariota y bacteria, pero la mayoría de sus especies pertenece al primero (Stengel et al., 2011). Sin embargo, el número de organismos denominados algas es mayor, si se consideran aquellos organismos pertenecientes al dominio procarionta, dentro de las cuales están las algas verde azuladas, de las cuales aún no se conoce mucho.

La importancia que revisten las algas para el medio ambiente radica en que son productores de primer orden, por lo que de ellas depende la obtención de nutrientes para otros seres vivos (Araujo et al., 2004). Sobreviven en ambientes que les ofrezcan luz y humedad para poder llevar a cabo sus funciones fotosintéticas. Las unicelulares miden de 3–10 μm y las pluricelulares alcanzan alturas hasta de 40m en zonas templadas (Díaz et al., 2003). En general, se dividen en dos grandes grupos: las microalgas encontradas en hábitat béntico y litoral como el fitoplancton, y las macroalgas encontradas en la zona litoral, como las algas rojas, verdes y pardas (El Gamal, 2010; Stengel et al., 2011).

Según Araujo et al., (2004) las aproximadamente 36.000 especies conocidas de algas sólo representan el 17% de las existentes en la tierra. Su diversidad es tan alta, que faltan

estudios para determinar todas las aplicaciones que puedan llegar a tener sus compuestos químicos (Stengel et al., 2011). Son pocos los compuestos que se han separado de los extractos de algas para determinar su bioactividad, ya que en la mayoría de los casos sólo se reporta la bioactividad del extracto teniendo en cuenta la sinergia entre todos sus compuestos (Stengel et al., 2011). Estos compuestos son moléculas bioactivas que sintetizan las algas tales como polifenoles, bromofenoles, ficobilinas, florotaninos, algunos compuestos sulfatados, vitaminas, esteroides, polisacáridos, carotenoides, algunos pigmentos, catequinas, ácidos grasos, proteínas, entre otros (Araujo et al., 2004; Cian et al., 2014; Sabeena et al., 2013).

Las investigaciones para encontrar aplicaciones de las moléculas bioactivas antes mencionadas por parte de las industrias de alimentos, bioenergía, fármacos, cosmética y agricultura, han aumentado el valor y demanda comercial de las algas a nivel mundial. Específicamente en farmacéutica, los extractos de algas marinas se están estudiando por sus propiedades como antivirales, antiinflamatorios antiparasitarios, antiasmáticos, antitumorales, antimicóticos, antimutagénicos, antimicrobianos, entre otros (Araujo et al., 2004; Echavarría, Franco, & Martínez, 2009).

1.1.1 Macronutrientes y micronutrientes de las macroalgas

Las macroalgas se encuentran en todas las zonas costeras del mundo, sin embargo cerca de 40 países se han especializado en su cultivo, cosechando cerca de 13 millones de toneladas de alga seca por año, de los cuales aproximadamente el 83% se destina al consumo humano, debido a su alto valor nutricional y beneficios para la salud. Los principales países productores son China, Corea, Japón Filipinas, Chile, Indonesia, Estados Unidos e India (Alvarez, Pardo, & Trespacios, 2007; Cian, Caballero, Sabbag, González, & Drago, 2014; El Gamal, 2010; Gupta & Abu-Ghannam, 2011; Mahadevan, 2015). Las algas crecen rápidamente en cultivos que les ofrezcan las condiciones medioambientales óptimas, las cuales pueden ser alteradas para estimular mayor producción de determinados compuestos bioactivos (Plaza, 2010).

A lo largo de la historia, las algas se han usado como alimento, especialmente en China y Japón, sin embargo Hawaii, Antillas, Indonesia, Malaysia, Las Filipinas, Tailandia, Chile y

Viet Nam también las comercializan con preparaciones diversas (Francavilla et al., 2013; McHugh, 2003; Villalobos et al., 2007). Se consideran una fuente importante de minerales y nutrientes para la dieta y también para el tratamiento de algunas enfermedades. Esto ha llevado investigar su composición química, la cual ha permitido encontrar metabolitos secundarios que exhiben múltiples bioactividades y potencial valor medicinal (Álvarez et al., 2007; Cian et al., 2014; El Gamal, 2010; Gupta et al., 2011; Sabeena et al., 2013; Nitschke et al., 2015).

A continuación se presenta la revisión bibliográfica de algunos compuestos bioactivos presentes en las macroalgas, tales como vitaminas, minerales, lípidos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, compuestos fenólicos pigmentos y carotenoides.

Las macroalgas contienen vitaminas y minerales, cuyos contenidos dependen de la especie y condiciones medioambientales. Las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, se desempeñan como coenzimas o precursores y antioxidantes, tales como las vitaminas B1, B6, B12, A, C, D, E, riboflavina, niacina, ácido pantoténico y ácido fólico. La vitamina E en sus formas alfa, beta y gamma, se presenta en mayor cantidad en las algas pardas que en las verdes o rojas, en las cuales predomina el tipo alfa-tocoferol y es de gran importancia para prevenir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. El contenido en minerales es de aproximadamente un 30% del alga seca, sin embargo, este contenido varía según las estaciones del año y las condiciones geográficas. Se encuentra principalmente sodio, calcio, magnesio, potasio y elementos traza como hierro, cobre, zinc y manganeso (Gupta & Abu-Ghannam, 2011), éstos minerales están presentes en mayor cantidad en las macroalgas, en comparación con los vegetales comestibles terrestres.

El contenido de lípidos de las algas oscila entre 0.57% y 3.5% de su peso seco, el cual cambia principalmente por condiciones ambientales, especie, época, edad, entre otros (Álvarez et al., 2007), siendo más alto en especies que crecen en aguas frías. Las algas contienen principalmente glicolípidos, seguidos de lípidos neutros y fosfolípidos (Plaza, 2010). Los ácidos grasos predominantes en las macroalgas son los poliinsaturados, con cadenas largas entre C15 y C24, los cuales se encuentran en cantidades superiores a las de plantas terrestres. Se destaca la presencia de ácido palmítico, oleico, araquidónico y eicosapentanoico (EPA), como fracción dominante de ácidos grasos en las algas rojas; sin embargo el ácido docosahexaenoico (DHA) está ausente en la mayoría de algas rojas,

excepto en *H. musciformis* y otras. La relación 5:1 entre omega 6 (ω :6) y omega 3 (ω :3) presente en algunas macroalgas, permite usarlas como ingredientes de nutracéuticos y alimentos funcionales (Kumari et al., 2013; Stengel et al., 2011).

Las proteínas en las macroalgas se encuentran en mayor cantidad en las algas rojas, hasta con un 47% bs, seguidas de las algas verdes, con niveles de 9 – 26% bs y pardas con 3 - 15% bs. Estos niveles varían según la especie y la condición climatológica (Fleurence, 1999; Pangestuti & Kim, 2015). Se distribuyen en la pared celular como enzimas, unidas a carbohidratos (glicoproteínas) o unidas a proteoglicanos o pigmentos (ficobiliproteínas de las algas rojas). Aunque la glicosidación y la presencia de compuestos fenólicos, limita la digestibilidad de las proteínas provenientes de algas, el valor nutricional de las proteínas es alto, debido a que contienen los aminoácidos esenciales, y potencian lecitinas específicas, péptidos y enzimas (Plaza, 2010; Stengel et al., 2011). Las proteínas con mayor bioactividad reportada, son las ficobiliproteínas y la lecitina; a esta última se le atribuyen propiedades antibióticas, antimicóticas, citotóxica, antiinflamatoria, hemoaglutinantes, entre otras (Nagano et al., 2002; Stengel et al., 2011). Por su parte, las ficobiliproteínas están involucradas en la fotosíntesis, absorben la luz que pobremente pueden absorber las clorofilas (450–650 nm) a profundidades moderadas; son proteínas solubles y fluorescentes que contiene grupos tetrapirrólicos unidos covalentemente; se dividen en tres grupos principales: ficocianinas, aloficocianinas y ficoeritrinas, éstas últimas están presentes en las algas rojas, a las que se les considera como sus principales pigmentos captadores de luz (Pangestuti & Kim, 2015). Las ficobiliproteínas purificadas, se emplean en cosmética, experimentos de fluorescencia, colorantes alimenticios, en terapias fotodinámicas de cáncer y leucemia, y bioactividades antiinflamatorias, antioxidantes, hepatoprotectivas, entre otras (Plaza, 2010).

Los aminoácidos esenciales y libres presentes en las proteínas de las macroalgas, también varían según la época del año y la especie; sus cantidades son más altas en algas rojas, que en verdes y pardas (Pangestuti & Kim, 2015; Stengel et al., 2011). La cantidad de aminoácidos esenciales presentes en el alga roja *Hypnea musciformis* y algunas especies del género *Gracilaria*, entre algunas otras macroalgas, se compara con el patrón de referencia de la FAO (Pangestuti & Kim, 2015). Predominan la glicina, alanina, arginina, el ácido aspártico y el ácido glutámico; los dos últimos generan características importantes en el sabor de las macroalgas. Sin embargo, Fleurence (1999) reporta limitaciones con la

lisina, treonina, triptófano, cisteína y metionina para algunas algas. Algunos compuestos de tipo aminoácido presentes en las macroalgas son el ácido aminobutírico, micosporina, ornitina, citrulina, taurina, entre otros.

Los polisacáridos están presentes en las macroalgas entre 33 a 50 g/100 g promedio; son un componente estructural de la pared celular y se desempeñan como moléculas de almacenamiento energético. La mayoría de polisacáridos no son digeribles y se consideran como fibra dietaria (Plaza, 2010; Rioux & Turgeon, 2015). Presentan una alta diversidad estructural, debida al amplio rango de posibles combinaciones entre sus unidades estructurales, acetilaciones, metilaciones, sulfataciones (para el caso de las algas). Además el contenido de polisacáridos presentes depende de factores medioambientales, físicos y biológicos (Stengel et al., 2011). De acuerdo al polisacárido de reserva característico, se ubican en determinado grupo taxonómico; para el caso de las algas rojas el principal carbohidrato de reserva es el almidón floreidano (amilopectinas como glucanos) (Plaza, 2010); otros polisacáridos presentes son el agar, carrageninas, celulosa, porfiranos, xilanos, entre otros. Los hidrocoloides son los polisacáridos más explotados industrialmente en las algas, los principales son las carrageninas y el agar, los cuales son sulfato galactanos, extraídos de la pared celular de las algas rojas (Villalobos et al., 2007), se emplean en cosmética, farmacéutica y alimentos. Ambos galactanos son capaces de formar geles; en alimentos se utilizan como sustancias espesantes, agentes de suspensión y estabilizantes (Camacho et al., 2012 (Cosenza et al., 2014)), por otro lado se han demostrado propiedades antivirales y anticoagulantes (Rioux & Turgeon, 2015).

1.1.2 Actividad antioxidante en las macroalgas

Las macro algas marinas han despertado gran interés en el campo de los antioxidantes naturales, por presentar fuertes sistemas de defensa frente al daño oxidativo al que están expuestas, debido a las condiciones adversas del ambiente marino donde crecen. Dado que para las macroalgas marinas se reportan contenidos lipídicos que no superan el 4% bs, se da una baja presencia ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs); en contraste con la cantidad total de proteína, puede llegar al 40% (Batista et al., 2009; Francavilla et al., 2013; Momin et al., 2013; Morales et al., 2010; Shareef et al., 2012). El daño celular ocasionado

por la radiación de energía ultravioleta (UVR) produce cambios sobre proteínas, ácidos nucleicos y principalmente sobre cloroplastos, modificando la cantidad, tamaño, organización y número de tilacoides, los cuales contienen en sus membranas lípidos y pigmentos fotosintéticos (Schmidt et al., 2012). Sin embargo se reporta, que los ácidos grasos polinsaturados de sus membranas tilacoidales, no presentan daño oxidativo (Aguilera et al.; Batista González et al., 2009; Morales et al., 2010).

Las macroalgas sintetizan y acumulan compuestos fotoprotectores, los cuales varían entre especies, para protegerse de los altos niveles de UVR. Entre éstos se encuentran los aminoácidos tipo micosporinas; clorofilas del tipo *a*; carotenoides, dentro de los cuales se incluyen carotenos (β y α -carotenos) y xantofilas (astaxantina, fucoxantina y zeaxantina); compuestos fenólicos, entre ellos varios ácidos fenólicos, ácidos cinámicos, florotaninos, catequinas, bromofenoles; vitaminas E y C y polisacáridos. Éstas moléculas son capaces de captar de radicales libres, quelar metales pro-oxidantes, aceptar y donar electrones, interrumpir la peroxidación lipídica e inactivar especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERON) (Batista et al., 2009; Gupta et al., 2011; Schmidt et al., 2012; Stengel et al., 2011; Bhuvaneswari et al., 2013; Chew et al., 2008; Cian et al., 2014; Devi et al., 2011; Echavarría et al., 2009; Frikha et al., 2011; Kindleysides et al., 2012; Lin et al., 2012; Sabeena et al., 2013).

Si bien no se han encontrado estudios que demuestren, cuál es el sinergismo que presentan cada uno de los componentes de un extracto ficológico, se ha establecido que los efectos antioxidantes, están vinculados con fracciones de variada composición química, ya que los extractos crudos que se analizan tienen diferentes metabolitos presentes (Batista et al., 2009; Morales et al., 2010; Bhuvaneswari et al., 2013; Devi et al., 2011; Frikha et al., 2011; Stengel et al., 2011).

▪ Carotenoides y otros pigmentos en macroalgas

Los carotenoides son tetraterpenos con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada extremo. Son solubles en disolventes no polares, presentan dobles enlaces conjugados, por lo que absorben en la región del visible y dan coloración intensa. Sin embargo, son inestables ante agentes químicos y físicos. Los carotenoides se dividen en

carotenos, los cuales no contienen oxígeno en sus anillos terminales, y en xantofilas, que si los tienen. Los carotenoides son considerados parte del sistema no enzimático (exógeno) de protección contra la oxidación, se cree que inactivan especies formadas por reacciones fotosensibles, tales como las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERON), en sinergismo con otros antioxidantes.

En las algas, la disponibilidad de nutrientes e intensidad de luz, presenta gran influencia en el contenido de carotenos. Sin embargo, la especie, la estación de recolección y otras condiciones medio ambientales también influyen. Las macroalgas rojas y cafés presentan los mayores contenidos de carotenoides, tales como el β -caroteno y xantofilas tales como astaxantina, zeaxantina y fucoxantina (Khairy & El-Sheikh, 2015). Schmidt et al., (2012), identificaron en el alga *H. musciformis*, la presencia de carotenoides tales como zeaxantina libre y esterificada, luteína y *cis* y *trans* β -caroteno. Cabe resaltar que los carotenos tienen actividad provitamina A, correspondiente al 100% para β -caroteno, mientras que la mayoría de xantofilas no son precursoras de ésta vitamina (Elena, Jáuregui, De, Calvo, & Romo, 2011; Romero, Guevara, D'armas, & Lodeyros, 2008).

Los pigmentos se clasifican de acuerdo a su estructura química; la clorofila a y b presentan tetrapirroles cerrados, la clorofila c presenta porfirinas, los ficobilipigmentos presentan tetrapirroles abiertos (Stengel et al., 2011) Todas las macroalgas presentan la clorofila a, y un grupo específico de pigmentos accesorios que identifican en gran medida cada grupo de macroalgas.

Los pigmentos que se encuentran unidos a proteínas, se conocen como ficobiliproteínas, entre estas la ficoeritrina, ficocianinas y aloficocianinas están presentes en las algas rojas y cianobacterias. Éstos absorben luz en zonas del espectro visible donde la clorofila tipo a absorbe pobremente. Se utilizan como colorantes en alimentos, cosméticos y marcadores fluorescentes. En cuanto a bioactividad, las ficobiliproteínas se reportan como antioxidantes, anti-inflamatorios, hepato-protectivos, entre otros (Pina et al., 2014; Stengel et al., 2011).

▪ **Compuestos fenólicos en macroalgas**

Las macroalgas producen metabolitos secundarios, entre los cuales los compuestos fenólicos son reconocidos por su actividad antioxidante, debido a que actúan como agentes reductores, donan hidrógenos, atrapan radicales libres y pueden actuar como quelantes de metales, que normalmente catalizan reacciones de producción de radicales (Vijayabaskar & Shiyamala, 2012). No sólo se resaltan por su actividad antioxidante, ya que presentan actividad anti-inflamatoria, inhibición de óxido nítrico en las células, (Li, Li, Ji, & Wang, 2007; Plaza, 2010)

Vidal et al., (2001) reportaron la presencia del ácido *p*-coumárico, ácido trans-cinnámico y ácido ferúlico en el alga roja *Bryothamnion triquetrum*. Por su actividad captadora de radicales libres *in vitro*, Blunt et al., 2014; El Gamal, 2010; Li et al., 2007, presentan las estructuras de varios bromofenoles presentes en macroalgas rojas, además varios florotaninos han sido reportados en algas marrón.

Schmidt et al., (2012) estudiaron de la influencia de la radiación UVBR (radiación ultravioleta B) sobre el alga *H. musciformis* y encontraron que el contenido de luteína y pigmentos fotosintéticos tales como aloficocianina, ficocianina y ficoeritrina disminuyó, se mantuvo la cantidad de clorofila *a* y de glutatión peroxidasa, mientras que aumentó el contenido de carotenoides tales como zeaxantina libre, *cis* y *trans* β -caroteno y compuestos fenólicos como epicatequina y galocatequina. También observaron que el incremento en la actividad mitocondrial y contenido de NADH deshidrogenasa produjo mayor cantidad de especies reactivas del oxígeno (ROS). Éstos resultados les permitieron afirmar que en respuesta a la elevada radiación, el alga desacelera su crecimiento y centra su energía en la activación de mecanismos antioxidantes de defensa celular no enzimáticos.

1.1.3 *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux

Figura 1-1. Imagen del alga *H. musciformis*



Es una macroalga del filo Rhodophyta ampliamente distribuida ya que tolera diferentes condiciones medioambientales y tiene un rápido crecimiento. Sus talos son filamentosos, uniaxiales, cilíndricos y delgados, miden entre 3 y 10 cm de longitud son curvados en los extremos con terminaciones en pequeños ganchos, los cuales le sirven para la reproducción vegetativa, sin embargo también se reproduce de forma asexual por esporas (Guiry, 2014).

Es conocida por producir grandes cantidades k-carragenina la cual es usada como aditivo en alimentos como embutidos, panes, lácteos (Camacho et al., 2012; Cosenza et al., 2014; Schmidt et al., 2012) que es un polisacárido de galactosa industrialmente utilizado por su poder gelificante, espesante, agente de suspensión y estabilizante (Camacho et al., 2012). Su clasificación taxonómica reportada en AlgaeBase (Guiry, 2014) es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Rhodophyta

Subfilum: Eurhodophytina

Clase: Florideophyceae

Subclase: Rhodymeniophycidae

Orden: Gigartinales

Familia: Cystocloniaceae

Género: *Hypnea*

Especie: *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux

1.1.4 *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe

Figura 1-2. Imagen del alga *G. mammillaris*



Es una macroalga del filo Rhodophyta se compone de más de 4000 especies agrupadas en 650 géneros, las cuales se caracterizan por tener ficoeritrinas y ficocianinas como pigmentos que les confieren su color rojo característico (Villalobos et al., 2007). Tiene 250µm de grosor en sus hojas, con pequeñas células corticales externas distribuidas en una capa continua, esta especie mide entre 3 y 14cm de altura (Schnetter et al., 1979).

Su distribución geográfica la ubica en América del Norte en las costas de California, Florida, Georgia, Luisiana y Carolina del Norte; en América central en las costas de Belice, el Salvador y Panamá; en las islas Caribe en Alabama, Barbaos, Cuba, Antillas Menores, Antillas Holandesas, Jamaica, Trinidad, Trinidad y Tobago; en África en las costa de Senegal; en Asia sudoriental en Vietnam e Indonesia; en las islas Pacífico en Fiji y en América del sur en Brasil, Colombia y Venezuela. (Guiry & Guiry, 2014). En Hawai especies de *Gracilaria* se venden y consumen como parte de ensaladas mezcladas con pescado fresco, por lo que son cultivadas en estanques; en las Antillas la consumen por supuestas propiedades afrodisíacas. En supermercados la comercializan como “sea moss” y también la emplean como base de una bebida no alcohólica; en Indonesia, Malaysia, Las Filipinas y Vietnam las personas de la costa las consumen como alimento (McHugh, 2003).

El género *Gracilaria* se considera importante para usos industriales y biotecnológicos, por lograr altos porcentajes de biomasa, es fuente del ficocoloide agar-agar, que es un polisacárido constituido por agarosa y agarpectina no tóxico, encontrado en la pared celular y espacios intracelulares. Se emplea como espesante en diferentes alimentos, medio de cultivo de muestras bacteriológicas y cosméticos (El Gamal, 2010; Francavilla et al., 2013; Villalobos et al., 2007). El agar de especies de *Gracillaria* se consideraba de baja calidad debido a du baja fuerza de gelificación, sin embrago en los años 1950s encontraron que un retratamiento del alga con un álcali antes de la extracción disminuía el rendimiento, pero aumentaba la calidad del agar (McHugh, 2003). Su clasificación taxonómica reportada en AlgaeBase (Guiry, 2014) es:

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Filo: Rhodophyta

Subfilum: Eurhodophytina

Clase: Florideophyceae

Subclase: Rhodymeniophycidae

Orden: Gracilariales

Familia: Gracilariaceae

Genéro: *Gracilaria*

Especie: *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe

1.1.5 Antecedentes de la actividad antioxidante de las macroalgas

Este trabajo de investigación se fundamenta en los antecedentes encontrados de la actividad antioxidante de extractos de macroalgas en sistemas in vitro y sistemas más complejos como lípidos de alimentos. De las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*, existen limitados estudios en éste aspecto (Chakraborty et al., 2013).

Karawita et al., (2004), encontraron que extractos con acetato de etilo, metanol y cloroformo del alga café *Hizikia fusiformis*, tienen AA significativamente alta frente a los

radicales NO• y DPPH, en comparación con antioxidantes comerciales. La fracción de cloroformo, fue eficaz para captar el radical hidroxilo, la fracción metanólica para captar radicales oxígeno singlete y la fracción de acetato de etilo, para inhibir la peroxidación lipídica. Al-Amoudi et al., (2009), realizaron un análisis de la composición química de tres especies de algas, *Ulva lactuca*, *Sargassum crassifolia* y *Digenea* sp., y ensayos de actividad antioxidante con extractos acuoso y metanólico mediante prueba de Ames, lipoxigenasa y DPPH. Aunque los extractos presentaron AA, no encontraron ninguna correlación entre la capacidad de reducir radicales libres y la composición química de las muestras. Del alga café *Turbinaria ornata* Vijayabaskar et al., (2012), obtuvieron su extracto metanólico para explorar la presencia de polifenoles a través del método de Folin-Ciocalteu, análisis de cromatografía y la AA a través de captación de radicales libres como DPPH, anión superóxido, hidroxilo y el radical de óxido nítrico. Concluyeron que debido a la alta presencia de contenido de polifenoles había una mayor AA del alga. (Lin, Tsai, & Chiu, 2012), estudiaron la AA de siete especies de algas cultivadas y comestibles del sur de Taiwan: *Enteromorpha intestinalis*, *Monostroma nitidum*, *Ulva lactuca*, *Dictyopteris undulata*, *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense*, *Laurencia intermedia*, y *Porphyra dentatase*, a través de captación de radicales libres con DPPH y anión superóxido. Los estudios demostraron que extractos de algunas de las algas marinas mostraron notable AA y sugieren que las algas podrían ser una fuente valiosa de antioxidantes naturales.

Pérez et al., (2010) analizaron la actividad antioxidante de los extractos acuosos de cuatro especies de algas rojas, de los géneros *Laurencia* sp, *Gelidium* sp, *Gracilaria* sp, y ficoeritrina aislada de *Bryothamnion* sp, comparados contra melatonina y vitamina E. En homogenatos de cerebro de ratas Wistar, midieron los hidroperóxidos lipídicos por el método FOX (oxidación del ion ferroso) y la peroxidación lipídica, enzimática y no enzimática, por el método de especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS). Además, determinaron la actividad antioxidante sobre el anión superóxido y el radical hidroxilo. Todos los extractos disminuyeron la concentración TBARS e hidroperóxidos, resaltando la ficoeritrina que fue comparable a la melatonina y vitamina E. Observaron el mismo comportamiento de los extractos en la inhibición del anión superóxido y el radical hidroxilo.

En Colombia, Echavarría et al., (2009) analizaron los extractos metanol/cloroformo 2:1 y n-hexano de cinco macroalgas Colombianas: *Caulerpa mexicana*, *Laurencia* sp., *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., y *Sargassum cymosum*. Determinaron su contenido de

compuestos fenólicos totales siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, y midieron su actividad captadora de radicales libres mediante el método del DPPH. Los resultados mostraron que todas las especies de macroalgas colombianas estudiadas presentaron actividad antioxidante, posiblemente asociada a su contenido de fenoles totales. Concluyen que diversas especies de algas colombianas representan una gran potencial en la búsqueda de sustancias con actividad antioxidante.

Éstas y otras investigaciones (Batista et al., 2009; Chew, Lim, Omar, & Khoo, 2008; Howe et al., 2006; Pérez et al., 2010), demuestran el potencial de diversas especies de algas como fuente de compuestos con AA medida en sistemas in vitro, especialmente a través de DPPH. Aunque estos antecedentes presentan una buena aproximación hacia la AA del recurso ficológico, es limitada la cantidad de investigaciones que reportan AA directamente en matrices alimentarias. Algunas investigaciones presentan resultados de la AA de extractos ficológicos en aceites:

Sabeena et al, (2013), seleccionaron 16 especies de algas marinas de Dinamarca, obtuvieron extractos acuosos y etanólicos y midieron su AA en aceite de pescado, a través de un ensayo de oxidación acelerada y contenido de fenoles totales e individuales. Concluyeron que el extracto etanólico fue el que más protegió el aceite de pescado de la peroxidación lipídica, por tener mayor contenido de fenoles, pero no ocurrió igual con todas los extractos de algas, por lo que mostraron que hay diferencias en el contenido de fenoles y su relación con AA. Otro estudio describe el uso potencial de los extractos de dos algas marinas pardas (*Ecklonia radiata*, *Macrocystis pyrifera*) y dos especies rojas (*Champia sp.* y *Porphyra sp.*) de Nueva Zelanda, como antioxidantes en aceite de merluza de cola (*Macruronus novaezelandiae*), evaluando la producción de productos de oxidación a una temperatura de 60°C y determinaron que los extractos liposolubles de las algas eran los que mayor capacidad antioxidante ofrecían al aceite, siendo las algas rojas superadas por las algas marrones; además, el extracto de *E. radiata* evaluado con el método DPPH mostró que los extractos tienen más capacidad antioxidante que el antioxidante sintético BHT (Kindleysides, Quek, & Miller, 2012). Garrido et al., (2008), estudiaron las propiedades antioxidantes y funcionales de extractos metanólicos de cinco algas chilenas: *Rhododymenia corallina*, *Gracilaria chilensis*, *Ulva lactuca*, *Durvillaea antarctica* y *Phorphyra columbina* en aceite de salmón tratado térmicamente y determinaron el contenido de polifenoles. Encontraron que el alga *Ulva lactuca* tuvo la mayor concentración de ellos, los extractos

de *Durvillaea antarctica* y *Gracilaria chilensis* presentaron un efecto protector sobre la oxidación del aceite de salmón.

En cuanto a la AA de las algas de estudio, son muy pocos los reportes de la AA en el alga *H. musciformis* y ninguno ha sido encontrado para el alga *G. mammillaris*.

Chakraborty et al., 2013, realizaron extracción del alga *H. musciformis* de India, con metanol y fraccionaron con n-hexano, acetato de etilo y diclorometano. La fracción de acetato de etilo fue la que presentó mejor contenido fenólico (205.5 mg GAE/g extracto), DPPH· (IC50 0.6 mg/mL), ABTS⁺ (IC50 0.51 µg/mL), habilidad de quelación de Fe²⁺ (IC500.70 mg/mL), H₂O₂ (IC50 0.39 mg/mL), e inhibición de TBARS (2.71 MDAEC/kg). Concluyen diciendo que *H. musciformis* es una buena candidata para incrementar la vida útil de los alimentos y combatir algunas enfermedades relacionadas con la oxidación.

1.2 Oxidación en alimentos

Para que se dé la oxidación, debe existir un sustrato oxidable y un agente oxidante, el primero corresponde a moléculas como carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otras (Rodríguez et al., 2001) y los agentes oxidantes son moléculas que presentan uno o más electrones sin aparear en el orbital externo conocidos como radicales libres (Venereo, 2002). Los radicales libres son muy inestables y reactivos, para alcanzar su estabilidad electroquímica, tienden a interactuar con las principales biomoléculas más cercanas a ellos, para sustraer un electrón dejando a la otra molécula como radical libre.

Entre los agentes oxidantes se destacan las clorofilas, metales como el hierro o el cobre, algunas enzimas, radicales libres y algunas especies no radicalarias. Los más conocidos son las especies reactivas del oxígeno (EROs), representadas por el oxígeno singlete (¹O₂), oxígeno triplete (³O₂), radical hidroxilo (HO[•]), radical peroxilo (RO[•]), radical anión superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el ácido hipocloroso (HOCl), entre otros. También las especies reactivas del nitrógeno (ERNs), que comprenden al óxido nítrico (NO) y el radical peroxinitrito (ONOO[•]) como las más estudiadas (Morales et al., 2010).

La oxidación en alimentos es causada principalmente por el deterioro de los lípidos, generando rancidez y/o pérdida de valor nutricional, color, olor, sabor y textura en el alimento. Los lípidos son afectados por la luz, calor, enzimas, metales y microorganismos. Estos agentes catalizan la oxidación lipídica, que puede ocurrir de cuatro maneras: auto-oxidación no enzimática, mediada por radicales libres; foto-oxidación, no enzimática no radicalaria, termo-oxidación y oxidación enzimática (Antolovich, Prenzler, Patsalides, McDonald, & Robards, 2002; Shahidi & Zhong, 2005).

La auto-oxidación, se da espontáneamente por la acción del oxígeno atmosférico en los lípidos, los cuales están presentes como ácidos grasos libres, triacilgliceroles, diacilgliceroles, monoacilgliceroles o fosfolípidos. Tanto la auto-oxidación como la termo-oxidación están mediadas por tres etapas: iniciación, propagación y terminación, descritas a continuación (Antolovich et al., 2002).

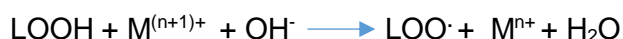
En la etapa de iniciación, la acción de la luz, calor, agentes ionizantes o catalizadores como metales, actúan como iniciadores de la reacción entre un sustrato (LH) que puede ser un lípido y un radical libre o especie reactiva del oxígeno ($R\cdot$), lo cual genera un radical alílico altamente reactivo ($L\cdot$):



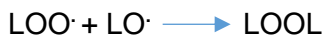
En la etapa de propagación el radical $L\cdot$ reacciona rápidamente con oxígeno para formar el radical peroxilo ($LOO\cdot$), el cual oxida un lípido para producir un hidroperóxido ($LOOH$).



Los hidroperóxidos se descomponen para producir alcoholes, aldehídos, cetonas, radicales alcoxílicos ($LO\cdot$) entre otros. Esta descomposición se puede catalizar por encima de 160 °C o con la presencia de metales de transición (M), lo cual forma radicales alcoxilo $LO\cdot$ y radicales peroxilo $LOO\cdot$



La etapa de terminación produce la combinación de radicales para formar productos no radicalarios como oxígeno, lípidos y peróxidos.



La foto-oxidación esta mediada por la acción del oxígeno singlete en ácidos grasos insaturados para producir hidroperóxidos conjugados y no conjugados. El oxígeno singlete es producido por sintetizadores como la clorofila en presencia de luz. La oxidación enzimática se caracteriza por la acción de lipoxigenasas en varios sustratos.

1.2.1 Antioxidantes

Son compuestos que proceden a prevenir o retardar la acción de agentes oxidantes en alimentos o sistemas vivos. Los antioxidantes se encuentran en menor proporción que los sustratos oxidables; en las células previenen o retardan el estrés oxidativo y en alimentos su actividad se determina por la capacidad de protección frente al daño oxidativo (Castro, 2013). Los antioxidantes reaccionan con los agentes oxidantes sacrificando su propia integridad, quedan como radicales de bajo potencial de reducción estándar (<500 mV). (Venereo, 2002).

Los antioxidantes no son tan efectivos si son extraídos de un alimento o si están en su forma pura, por lo que necesitan la presencia de otros componentes para cumplir su función y ser bien absorbidos, lo cual es conocido como un efecto de sinergismo. Sin embargo, este aspecto requiere mayor cantidad de estudios (Araya et al., 2003; Chasquibol et al., 2003).

1.2.2 Clasificación de los antioxidantes

Según la acción que desempeñan, se clasifican en antioxidantes primarios (AH) o de ruptura de cadena, si actúan retrasando o inhibiendo la etapa de iniciación o propagación en la oxidación de un lípido. Para ello reaccionan con el radical lipídico ($L\cdot$), el radical alcoxilo ($LO\cdot$) o el radical peroxilo ($LOO\cdot$), donándoles su hidrógeno del grupo OH más reactivo, por lo que se convierte en un radical antioxidante ($A\cdot$) con un potencial estándar de reducción más bajo y menos reactivo, debido a la resonancia que genera el anillo aromático sobre el radical. Cabe resaltar que la eficiencia de un antioxidante es mayor si la fuerza de enlace entre el H y el O, del grupo OH es baja (Antolovich et al., 2002).



Los radicales antioxidantes pueden reaccionar con alcoxilos y peroxilos para formar especies neutras y detener la oxidación:



Los antioxidantes secundarios o preventivos quelan metales, desactivan el oxígeno singlete, absorben la radiación UV, entre otros. Dentro de ellos cabe destacar los carotenos.

Otra clasificación los diferencia como antioxidantes exógenos y endógenos. Los antioxidantes que provienen de la dieta se llaman exógenos, tales como las vitaminas C y E, betacaroteno, y compuestos fenólicos dentro de los que cabe resaltar flavonoides, quercetina y polifenoles, entre otros y los antioxidantes endógenos son los que son sintetizados por las células tales como glutatión, coenzima Q, entre otros (Avello et al., 2006; Rodríguez et al., 2001). En las reacciones del metabolismo celular se producen radicales libres en cantidades moderadas, los cuales son inactivados naturalmente por

antioxidantes endógenos (Rodríguez et al., 2001). Éstos radicales presentan funciones vitales como participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno, prostaglandinas, activar las enzimas de la membrana celular, entre otras y para luchar contra virus y bacterias (Avello & Suwalsky, 2006; Venereo, 2002). Sin embargo, el exceso producido por malos hábitos sobrepasa la capacidad de los antioxidantes endógenos, lo cual lleva al estrés oxidativo celular, causante de diversas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, la diabetes y en general el envejecimiento celular (Fernández et al., 2011; Rodríguez et al., 2001; Venereo, 2002).

Según su origen, se clasifican en naturales y sintéticos. Los antioxidantes sintéticos tales como el 3-terbutil-4-hidroxianisol (BHA), el 3,5-di-terbutil-4-hidroxitolueno (BHT), el TBHQ (terbutil-hidroquinona), ácido sórbico, galato de propilo, entre otros, son producidos en el laboratorio. El uso de estos antioxidantes se ha venido restringiendo, ya que algunas investigaciones demuestran riesgos para la salud y toxicidad al consumirlos, alta volatilidad e inestabilidad térmica (Grice, 1988; Polat et al., 2013). Por este motivo, diversos estudios se han centrado en la extracción de compuestos con capacidad para atrapar radicales libres de fuentes naturales, entre estos cabe resaltar los carotenoides y fenoles, sin embargo, el problema radica en los altos costos de extracción de los productos vegetales en comparación con los costos de los antioxidantes sintéticos (Kindleysides et al., 2012).

Entre los antioxidantes naturales, algunos de los grupos y subgrupos más importantes son (Chasquibol et al., 2003):

Terpenos

Carotenoides: licopenos, alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína, zeaxantina, capsaicina.

No carotenoides: saponinas, perilil-alcohol, terpineol, limonoides, fitoesteroles (ergosterol, beta-sitoesterol).

Fenoles

Flavonoides: antocianinas, catequinas, isoflavonas (fitoestrógenos), hesperidina (flavonona), naringina, rutina, quercetina, tangeretina, taninos.

Ácidos fenólicos (no flavonoides): ácido elágico, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido p-cumárico, ácido fítico (fitato), vainillina, ácido cinámico, ácido rosmarínico.

Otros polifenoles no flavonoides: curcuminoides, gingeroles, resveratrol, lignanos (fitoestrógenos).

Compuestos azufrados (tioles):

Glucosinolatos

Tiosulfonatos: compuestos organosulfurados, sulfuros alílicos

Indoles

Tocoferoles y tocotrienoles

1.2.3 Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Los antioxidantes cambian su actividad en un alimento, dependiendo de la temperatura, composición y estructura del alimento. La evaluación de la AA se puede lograr monitoreando productos de la oxidación, los cuales dependen de las condiciones a las cuales se llevó a cabo la oxidación, por ejemplo freído o almacenamiento (Gordon, 2001). Entre otros se pueden citar los siguientes métodos de monitoreo:

La capacidad de reducir radicales libres, se simula con radicales sintéticos en disolventes orgánicos a temperatura ambiente, como 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), 2,2 -azino-bis-3-etil benzotiazolin-6- sulfonato de amonio (ABTS), poder antioxidante de reducción férrica (FRAP). En DPPH se monitorea el cambio rápido de absorbancia a 515 nm, debido a la reducción que produce el antioxidante en el radical. El catión ABTS reacciona más rápido que DPPH con los antioxidantes, se emplea persulfato de potasio para oxidar el ABTS y luego se monitorea el cambio de absorbancia a 734 nm debido a la reducción producida por los antioxidantes. En FRAP se mide la capacidad de un antioxidante para reducir el hierro Fe^{+3} presente en el complejo 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a Fe^{+2} a

una longitud de onda entre 590 y 595 nm. La decoloración del beta-caroteno es una reacción donde los radicales libres destruyen la conjugación del β -caroteno, disminuyendo su capacidad de absorción a 455 nm (Jan Pokorny & Gordon, 2001).

Aunque estos métodos ayudan a identificar antioxidantes, determinar su efectividad es más complejo, especialmente en matrices alimentarias, por la presencia de otros componentes, solubilidad, polaridad, entre otros.

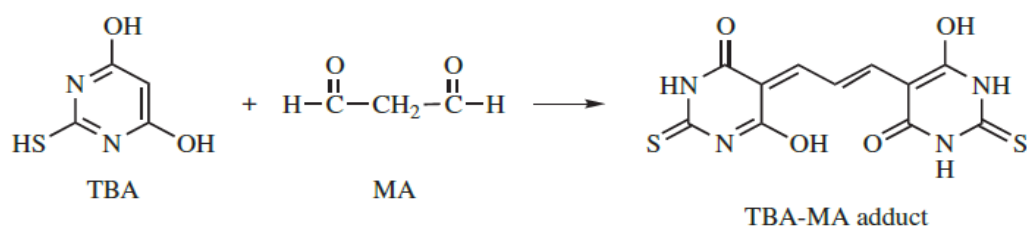
El valor de peróxidos (PV) indica la formación de hidroperóxidos o la reducción de su descomposición, mediante titulación. En un aceite con yoduro de potasio en una mezcla de ácido acético-cloroformo, los hidroperóxidos oxidan el yoduro a yodo, se determina por titulación con tiosulfato de sodio. PV no es apta para medidas de freído de aceites, ya que los hidroperóxidos se descomponen por encima de los 150 °C. El valor de *para*-anisidina evalúa la oxidación lipídica secundaria, a través de la reacción entre los aldehídos volátiles y no volátiles producidos, que reaccionan con *para*-anisidina, cuyos productos absorben a 350 nm (en especial con 2-alquenal). La extensión total de la oxidación (Totox), es el resultado de la suma del valor de *para*-anisidina mas dos veces el valor de PV, aunque es una medida empírica por sumar valores con unidades diferentes.

El método de dienos conjugados se basa en la formación de hidroperóxidos en PUFAs, que permiten la conjugación de la estructura pentadieno, la cual absorbe radiación UV a 243 nm. Sin embargo, productos de descomposición de los hidroperóxidos, como el ácido 9-hidroxiocadeca-10,12-octadienoico y el ácido 13-hidroxiocadeca-9,11-dienoico, también presentan, estructura conjugada por lo que contribuyen a la absorbancia.

La medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, permite hacer seguimiento a la formación de compuestos secundarios en la oxidación de lípidos, debido a la inestabilidad y susceptibilidad a la descomposición, de los productos primarios. Se forma una mezcla compleja de aldehídos, cetonas, alcoholes, ácidos volátiles, epoxycompuestos, entre otros, (Shahidi & Zhong, 2005). El ensayo del ácido tiobarbitúrico (TBA), permite evaluar la concentración del malondialdehído (MDA), un producto formado por la degradación de ácidos grasos polinsaturados, que reacciona con el TBA y forma un complejo rosado que puede ser medido espectrofotométricamente, con un máximo de absorción entre 532-535 nm (Figura 1-3) (Gordon, 2001). El ensayo se cuantifica a través de una curva de

calibración con malondialdehído bis (dimetilacetal-TMP o dietilacetal-TEP) como fuente de MDA (Antolovich et al., 2002). Sin embargo el ensayo no es específico para MDA, ya que el TBA puede reaccionar con alcanales, 2-alquenes y 2,4-alcadienes que contribuyen a la absorbancia, también algunas proteínas, productos pardeados de Maillard y productos de degradación de azúcares afectan la medida (Gordon, 2001; Shahidi & Zhong, 2005).

Figura 1-3. Reacción del ácido 2-tiobarbiturico (TBA) y malondialdehído (MDA)



Fuente: (Antolovich et al., 2002; Shahidi & Zhong, 2005)

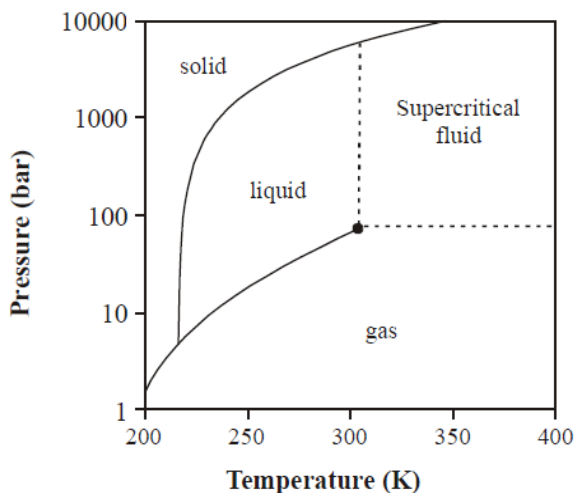
Se reportan además otros métodos como el valor de octanoato, la medida de trienos y tetraenos, análisis sensorial, espectroscopia infrarroja con transformada de fourier (FTIR) y técnicas recientes que emplean cromatógrafos con distintos arreglos, como el análisis de espacio de cabeza en estático y en dinámico, cromatografía de gases olfatométrica, microextracción en fases sólida-gases-masas, o la nariz electrónica equipada con gran cantidad de sensores, que analizan los compuestos volátiles que detecta (Bartosz & Kolakowska, 2011).

Para evaluar cambios en la oxidación, se monitorea la pérdida de PUFAs, y el peso ganado después del periodo de inducción. Dentro de los métodos predictivos, donde los aceites son monitoreados constantemente, durante condiciones de oxidación acelerada, se reportan el método de calorimetría diferencial de barrido, índice de estabilidad oxidativa y oxipress (Gordon, 2001).

1.3 Extracción con fluidos supercríticos

El estado supercrítico se basa en llevar cualquier fluido a presión y temperatura por encima de su punto crítico termodinámico, lo cual le otorga características especiales. Con el diagrama de fases de una sustancia pura, (Figura 1-4) se pueden observar las curvas de equilibrio para la sublimación (entre los estados sólido y gas), fusión (entre los estados sólido y líquido) y ebullición (entre los estados líquido y gas). Al final de la curva de vaporización, el punto crítico marca el final de la coexistencia entre la fase líquida y gas. Por encima del punto crítico, un fluido no podrá ser licuado ni evaporado, lo cual corresponde a una única fase. Las propiedades termodinámicas de un compuesto llevado por encima de su punto crítico varían en función de la presión y temperatura, esto lo convierte en un fluido supercrítico (FS) (Castro, 2013; Ghude et al., 2013; Peralta et al., 2011).

Figura 1-4. Diagrama de fases para el dióxido de carbono



Fuente: (Sapkale, Patil, Surwase, & Bhatbhage, 2010)

Los fluidos supercríticos (FS) presentan un estado intermedio entre líquido y gas; esto hace que sus características físico-químicas como difusividad, constante dieléctrica, viscosidad y densidad varíen en relación con sus condiciones normales. Esas variaciones ha sido ampliamente estudiadas con diferentes solventes de interés por la capacidad que presentan de difundirse como los gases y disolver como los líquidos (López et al., 2013).

La alta selectividad de un FS se ajusta variando presión y temperatura para generar diferentes rendimientos de extracción. El tiempo de extracción es reducido por la baja viscosidad, alta difusividad y nula tensión superficial que presentan (Peralta et al., 2011). La densidad de un FS, es intermedia entre la de un líquido y un gas, esto le genera condiciones de solvatación especiales; esta propiedad se puede manipular variando la presión. Adicionalmente son altamente compresibles (Mahdi et al., 2014). Los FS actúan expandiendo la muestra y rompiendo la mezcla de múltiples componentes basándose en la volatilidad de cada uno para que se infiltren en la capa permeable del sólido liberando los analitos de interés (Jahurul et al., 2012). En la tabla 1-1, se relacionan los disolventes que se han empleado en condiciones supercríticas.

Tabla 1-1. Propiedades supercríticas de algunos compuestos comúnmente usados como fluidos supercríticos

Sustancia	T_c (K)	P_c MPa (atm)
Dióxido de carbono	304.1	7.3 (72.9)
Agua	647.1	22.1 (21775)
Metano	190.4	4.6 (45.4)
Etano	305.3	4.9 (48.1)
Propano	369.8	4.2 (41.9)
Etanol	513.9	6.1 (60.6)
Metanol	512.6	8.1 (79.8)
Acetona	508.1	40.7 (46.4)

Fuente: (Sapkale et al., 2010)

Si bien el etanol y propanol presentan mayor solubilidad que el dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC), los primeros son más costosos e inflamables (Akanda et al., 2012). El CO₂-SC es el disolvente usado en más del 90% de las EFS. Es útil para disolver componentes no polares o de baja polaridad, sin embargo, al adicionarle pequeñas cantidades de solventes polares como metanol o etanol, su solubilidad en componentes polares aumenta (Akanda et al., 2012). Debido a la baja presión y temperatura que necesita el dióxido de carbono para llegar a su estado supercrítico (31,3°C y 72,9 atm), garantiza la no destrucción de productos termolábiles. Otras razones para su uso son su bajo costo, alta disponibilidad, no es tóxico ni inflamable, además no contamina la muestra y se puede reciclar con sistemas adecuados al extractor de FS (Akanda et al., 2012; Mahdi et al., 2014).

Si bien existen sistemas de extracción supercrítica dinámicos, estáticos, de tamaño industrial o de poca capacidad, los sistemas de EFS en general cuentan con un reservorio del FS correspondiente al cilindro con CO₂, un sistema de presurización que consiste en una bomba que le da al fluido la presión crítica o superior sin pulsaciones y constante, siendo comunes los compresores de gases, bombas neumáticas o bombas empleadas en cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). Una celda de extracción que debe ser resistente a las altas presiones e inerte, la cual se encuentra dentro de una chaqueta de calentamiento asociada a una termocupla. Un sistema de restrictores que son tubos largos de diámetro pequeño que bajan la presión del solvente y un sistema de recolección de muestra que puede ser un solvente, una trampa criogénica o una columna cromatográfica. Algunos sistemas de EFS tienen dos bombas para impulsar fluidos simultáneamente (mezclas supercríticas) o cosolventes para lo cual se requiere una cámara de mezclado antes del extractor. Algunos equipos, reemplazan los restrictores por separadores o recipientes de despresurización que cambian la temperatura o presión de la fase extractante separando de una vez sus componentes con los analitos importantes. También se usan restrictores para controlar el flujo junto con separadores para fraccionar los extractos (Castro, 2013; Ghude et al., 2013).

1.3.1 Ventajas de EFS

Debido a que las plantas poseen diversidad de compuestos producidos en su metabolismo secundario, los cuales son de interés por su bioactividad para las industrias de alimentos, cosmética, farmacéutica, entre otras; se buscan técnicas de extracción de los mismos cada vez más eficientes, conservativas y selectivas, que eviten el uso de grandes cantidades de solvente y energía, a lo cual están relacionadas técnicas extractivas como la maceración, hidrodestilación y Soxhlet (Velasco, Villada, & Carrera, 2007). Los métodos convencionales requieren mayor cantidad de solvente y tiempo, de tal modo que el Soxhlet se ha convertido en una técnica de referencia para comparar rendimiento con otros métodos de extracción sólido líquido (Velasco et al., 2007).

La extracción con solventes orgánicos como hexano, es principalmente usado para obtener aceites comestibles de las plantas debido a su alta solubilidad, rendimiento y facilidad de recuperación. Sin embargo, estudios lo ubican en la lista de los más contaminantes del aire y peligroso para la salud humana, por tener propiedades tóxicas y

cancerígenas (Castro, Benelli, Ferreira, & Parada, 2013; Jahurul et al., 2012). El uso de otros solventes alternativos como isopropanol, agua, etanol, d-cineno e hidrocarburos, entre otros, se ha incrementado, pero pueden ser más costosos y ofrecer menor recuperación. Otras técnicas de extracción actualmente usadas son las asistidas por ultrasonido, microondas o con solvente acelerado (Velasco et al., 2007).

Adicionalmente a las técnicas anteriores, la EFS es una técnica que desde 1960 ha sido usada en la obtención de extractos o preparación de muestras (Castro, 2013). Presenta las siguientes ventajas frente a las técnicas convencionales (Ghude et al., 2013; López et al, 2012; Mahdi et al., 2014):

- Se considera ambientalmente amigable al remplazar los tradicionales solventes orgánicos por CO₂, NH₃ o H₂O, entre otros.
- Permite la separación rápida del solvente y el analito al disminuir la presión al final del proceso extractivo.
- Mejora tiempos de extracción debido a la baja viscosidad y alta difusividad (la difusividad de FSC es de 10⁴ cm² /s y la de un solvente líquido es de 10⁵ cm² /s), por lo cual penetra más rápido la muestra sólida para hacer la transferencia de masa (Ghude et al., 2013).
- Permite el estudio de compuestos termolábiles al trabajar con bajas temperaturas
- Permite acoplar métodos cromatográficos para identificar y cuantificar los analitos.

La calidad en la obtención de extractos vista desde su composición y bioactividad, se encuentra influenciada por la elección del solvente como fluido supercrítico y las condiciones termodinámicas a las que se le someta, el tamaño y pre tratamiento de la muestra, el número de celdas de extracción, la tasa del flujo del solvente, entre otros (Akanda et al., 2012).

Las aplicaciones de la EFS en campos como la ciencia de alimentos, farmacéutica y medio ambiente se han venido publicando principalmente en los últimos veinte años (Akanda et al., 2012) para evaluar componentes de productos naturales o alimenticios, recuperar metales pesados, aceites, entre otros; cuyo principal objetivo es extraer componentes de

alta calidad y pureza. La aplicación de EFS en el análisis de alimentos ha sido principalmente en descafeinar el café y el té, desgomar, blanquear, purificar fraccionar aceites, extraer aceites esenciales, grasas y lípidos, separar componentes nocivos de productos nutracéuticos, eliminar el colesterol, extracción de alcaloides, aromas y especias, extracción de componentes minoritarios de alto valor como algunos fenoles (Akanda et al., 2012; Benavides et al., 2013; López et al., 2013). Para ello, el principal solvente utilizado es el CO₂-SC en ocasiones mezclado con co-solvente para aumentar su polaridad y por las características arriba mencionadas.

1.4 Extracción Soxhlet

Es una técnica de extracción de muestras sólidas con disolventes, fisicoquímicamente conocida como lixiviación. Como pretratamiento de muestras se ha empleado por más de un siglo, desde que Franz von Soxhlet en 1879 diseñó el equipo (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998). Éste consta de un reservorio de disolvente, una celda de extracción donde se coloca la muestra (dentro de un dedal) y un condensador. Se calienta el disolvente hasta su punto de ebullición, luego se condensa en el destilador cayendo directamente sobre la muestra. Cuando alcanza el nivel de sifón, el disolvente regresa al reservorio cargado de analitos extraídos y vuelve a empezar el proceso. El rendimiento depende de procesos de difusión interna mediados por las características de la muestra y del tamaño de sus partículas. Debido a la recirculación del disolvente se le considera como una extracción de carácter continuo que se emplea principalmente en la actualidad, como técnica estándar de referencia frente a otros métodos extractivos sólido – líquido. (Velasco et al., 2007).

La elección del disolvente de extracción se basa en que tenga alta solubilidad por los analitos de interés, estabilidad química, baja presión de vapor, baja inflamabilidad y toxicidad, entre otros (Velasco et al., 2007). Sin embargo, los disolventes comúnmente empleados en la extracción Soxhlet son hexano, metanol éter de petróleo, y éter etílico, los cuales son tóxicos para la salud y el medio ambiente. Debido a las altas cantidades de disolvente empleado es obligatorio la posterior rota-evaporación. Adicionalmente, las extracciones se realizan a temperaturas que pueden degradar análisis termolábiles, empleando vacío en el sistema, se disminuye el punto de ebullición del disolvente (Luque de Castro & García-Ayuso, 1998).

2. Planteamiento del problema

La conservación de alimentos es un punto crítico de la ciencia y tecnología de alimentos. Esto se debe a que los productos presentan un límite de tiempo en el cual su calidad se ve disminuida, tornándolos inaceptables para el consumidor. El límite de tiempo se conoce como vida útil, y los mecanismos de deterioro por los cuales se va haciendo más corta pueden ser físicos, microbiológicos o químicos. Si bien los lípidos son importantes componentes de la mayoría de los alimentos, que contribuyen de manera significativa con su valor nutricional y sensorial, también son los principales responsables del deterioro en la calidad del alimento, debido a su distribución, composición química, reactividad e interacción con otros componentes de la matriz alimentaria (Kolakowska et al., 2003). La autoxidación y fotoxidación son la forma más común de deterioro de lípidos, los aceites vegetales son susceptibles por la presencia de ácidos grasos insaturados expuestos al oxígeno y la luz; dado que el deterioro de un aceite vegetal sólo se retarda, se emplean compuestos naturales y sintéticos que los protegen de la oxidación lipídica por un tiempo determinado, llamados antioxidantes (Pokorny et al., 2001). Estos retrasan la formación de hidroperóxidos, los cuales posteriormente dan lugar a compuestos aromáticos volátiles, aldehídos, radicales libres, entre otros productos, que no sólo son responsables por cambios de color, aroma, sabor y/o textura y pérdida de nutrientes, sino que dan lugar a enfermedades en los consumidores de estos aceites vegetales, debido a daños a las proteínas, incluyendo enzimas, o en el ADN que podría desencadenar cáncer o enfermedades cardiovasculares, neuronales como Parkinson y Alzheimer, entre otras (Pokorny et al., 2001; Valenzuela et al., 2007).

Actualmente la conservación de alimentos se centra en el uso de antioxidantes sintéticos, tales como terbutil-hidroquinona (TBHQ), butil- hidroxitolueno (BHT) o butil-hidroxianisol (BHA). El uso de estos antioxidantes se encuentra bastante regulado en cuanto a la cantidad a emplear, por su alta volatilidad e inestabilidad, además recientes

investigaciones resaltan los riesgos para la salud y toxicidad al consumirlos (Bhuvaneshwari et al., 2013; Castro et al., 2013; Sabeena et al., 2013). Adicionalmente, el daño a moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos se ha visto relacionado con procesos degenerativos y patológicos resaltando enfermedades cardiovasculares, neurológicas y carcinogénicas (Polat et al., 2013; Rodríguez et al., 2001). Sin embargo se emplean debido a que no hay estudios contundentes, por otro lado son más económicos y en algunos casos más eficaces que los naturales (Castro, 2013).

Revisiones existentes de la diversidad y aprovechamiento potencial de las algas marinas en Colombia, permiten determinar que investigadores especializados en el campo de la ficología en el país, han venido construyendo conocimiento en los campos de biología, taxonomía, ecología y composición química, así como de su aprovechamiento en bioacumulación, extracción de ficocoloides y compuestos bioactivos, acuicultura, ingeniería química, entre otros (Albis-Salas et al., 2011; Álvarez et al., 2007; Echavarría et al., 2009). Sin embargo, proporcional a la gran diversidad de especies que se tiene en las costas del mar caribe y las del océano Pacífico, falta ampliar el conocimiento que se tiene de las algas marinas, así como su aprovechamiento sustentable.

Por otro lado, el uso de algunas metodologías convencionales de extracción, resultan nocivas para el medio ambiente, esto se debe a que requieren grandes cantidades de solvente, energía y tiempo. Soxhlet, maceración, hidrodestilación, entre otras, pueden emplear solventes orgánicos tales como hexano, acetona, éter etílico, cloroformo, entre otros (p.e. el hexano es un contaminante ambiental de alta peligrosidad) (Velasco et al., 2007). Otra desventaja es la separación del solvente del extracto, ya que las altas temperaturas requeridas pueden destruir sustancias de valor y puede quedar solvente orgánico remanente en el mismo (Ghude et al., 2013; Mahdi et al, 2014).

Para abordar la problemática anterior, se plantea como hipótesis de investigación que las algas rojas *H. musciformis* y *G. mammillaris*, colectadas en el caribe colombiano, son fuente promisoría de extractos capaces de retardar la oxidación lipídica de aceites comestibles. Dichos compuestos pueden ser extraídos de forma eficiente empleando EFS. La variación de las condiciones de extracción empleadas en la EFS (presión, temperatura y co-solvente) permitirá modificar la composición y AA de los extractos, en busca de las condiciones más adecuadas para la obtención de extractos con alta AA. Por otra parte, los

extractos con mayor AA podrán ser empleados como sustituyentes de los antioxidantes sintéticos actualmente usados o como fuente de compuestos destinados a tal fin.

Lo anterior podría proporcionar valor agregado al recurso fitológico del país al fomentar la generación de nuevas alternativas para extender su aplicación, el conocimiento de nuestros productos naturales, y al proporcionar a la industria alimentaria nuevas fuentes de biomoléculas con AA. Adicionalmente, los habitantes de las zonas costeras se podrían ver beneficiados con el impulso de proyectos productivos de cultivos generados a partir de las algas.

Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante en un aceite vegetal comestible, de extractos procedentes de las algas *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux y *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe, obtenidos mediante extracción Soxhlet y extracción con fluidos supercríticos.

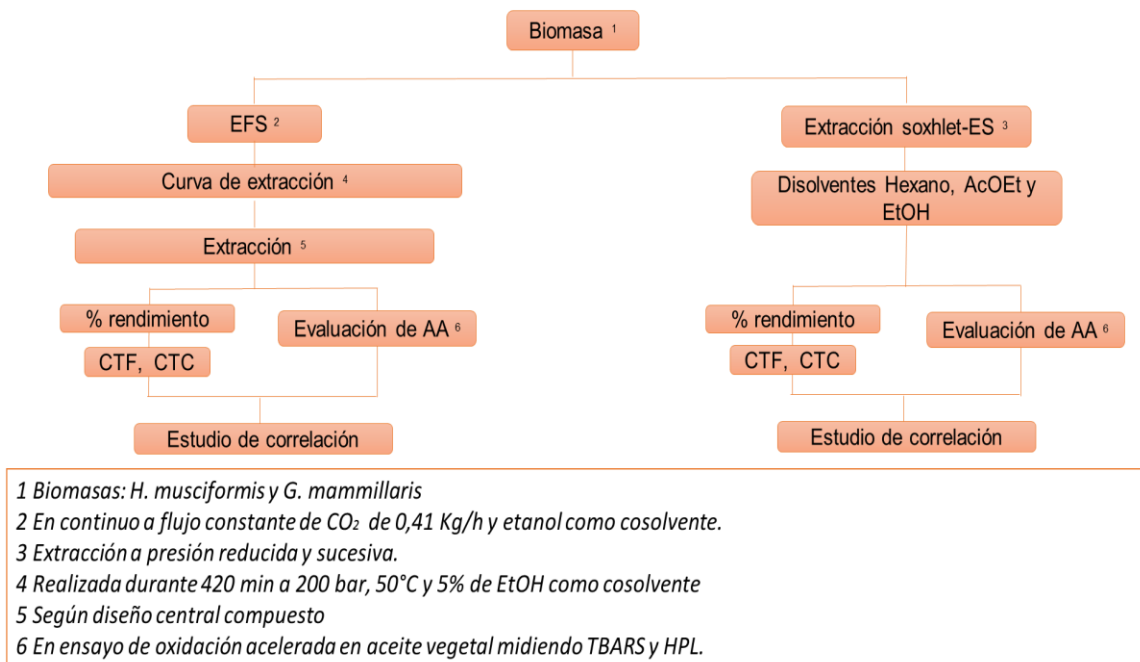
2.2 Objetivos específicos

- Someter a extracción con fluidos supercríticos las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*, evaluando el efecto de algunas de las variables del proceso sobre el rendimiento de extracción, el contenido total de fenoles y de carotenoides, como también la actividad antioxidante de los extractos.
- Contrastar las variables de estudio de los extractos obtenidos por EFS, contra las correspondientes de los extractos obtenidos por una técnica tradicional de extracción.
- Estudiar la posible correlación entre la actividad antioxidante de los extractos obtenidos con el contenido total de fenoles y de carotenoides.

3. Metodología

Para alcanzar los objetivos propuestos, se desarrolló la metodología esquematizada en la figura 2-1. Se obtuvieron extractos de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*, mediante EFS variando las condiciones de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente (EtOH) y ESPr con disolventes de diferente polaridad. Para determinar la actividad antioxidante, los extractos se agregaron a un aceite comestible libre de antioxidantes, a una concentración conocida. Mediante ensayo de oxidación acelerada por 6 días, se cuantificaron algunos productos de la oxidación lipídica. Los productos iniciales se cuantificaron a través de los hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL) y los productos finales a través de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Adicionalmente, a todos los extractos se les evaluó el contenido total de fenoles (CTF) y el contenido total de caroteno (CTC) y se evaluó la posible correlación de dichos valores con la AA.

Figura 3-1. Esquema general de la metodología



3.1 Obtención y preparación de las biomosas

Las muestras de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris* se recolectaron en el litoral rocoso de la playa del Aeropuerto Simón Bolívar, de la ciudad de Santa Marta (coordenadas 11:07'N y 74:14'W) en el mes de julio del año 2014. Esta recolección se llevó a cabo por investigadores del grupo de Biotecnología y Bioprospección de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. La identificación taxonómica fue realizada por el biólogo marino Ramón Alejandro Plazas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Las algas se sometieron a limpieza manual de epífitos, lavado y secado a 45°C en un horno al vacío por 48 h, hasta obtener peso constante. Posteriormente se molieron y tamizaron. Las muestras con tamaño de partícula inferior a 0,3 mm se seleccionaron para la ESPr y con tamaños entre 0.3 mm y 0.5 mm para EFS.

3.2 Obtención de extractos

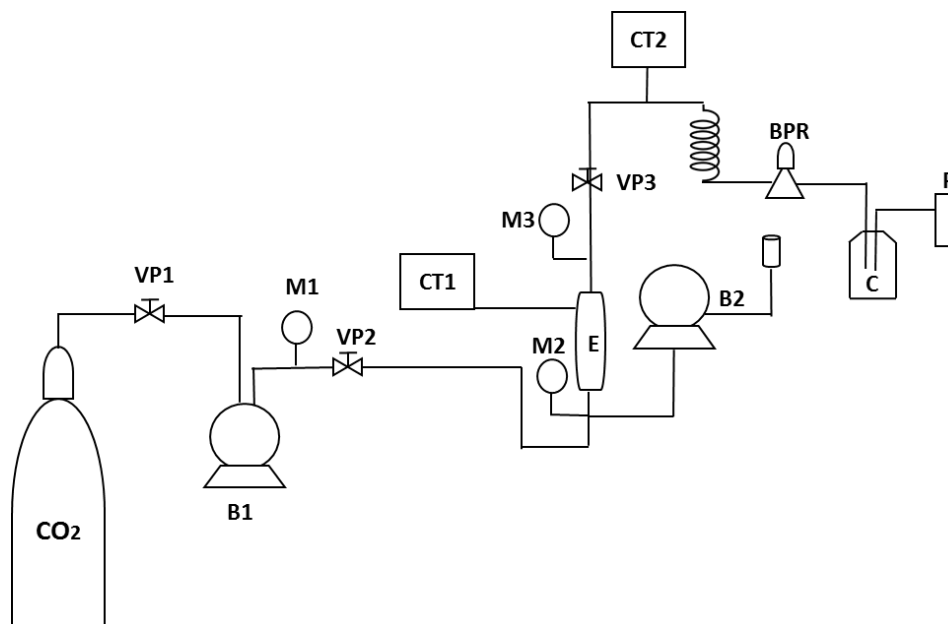
Para las dos algas objeto de estudio se realizó EFS y ESPr como se describe a continuación. Posteriormente para todos los extractos se determinó su rendimiento, CTF, CTC y AA, esta última en un aceite vegetal comestible.

3.2.1 Extracción con fluidos supercríticos

Con esta técnica se evaluaron las condiciones de extracción (presión, temperatura y porcentaje de cosolvente), asociadas a la mayor AA de los extractos de las algas. Para ello, inicialmente se fijó un flujo constante de CO₂ y se determinó el tiempo de extracción para cada alga, mediante curvas de extracción (CE). A través de un diseño central compuesto, se determinaron las condiciones de presión, temperatura y porcentaje de cosolvente, más adecuadas, para cada alga.

La obtención de extractos supercríticos para las algas *Hypnea musciformis* y *Gracilaria mammillaris*, se llevó a cabo en un equipo de extracción supercrítica que funciona en modo dinámico; éste pertenece al laboratorio de fluidos presurizados del Departamento de Química, Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. El equipo (figura 2-2) consta de: un tanque de CO₂, válvulas de paso (VP1-VP3), una bomba de membrana (B1) para dosificar el CO₂, una bomba de pistón para HPLC (B2) para dosificar el cosolvente, manómetros (M1-M3), una celda de extracción (E), controladores de temperatura (CT1 y CT2), una válvula reguladora de presión (BPR), un frasco colector (C) y un flujómetro (F).

Figura 3-2. Diagrama del equipo de extracción con fluidos supercríticos



Todas las extracciones se realizaron a un flujo constante de CO₂ de 0.4 Kg/h. Para cada extracción, se empleó aproximadamente 25.00 ± 0.06 g del alga *H. musciformis* y 14.00 ± 0.02 g del alga *G. mammillaris*. La muestra se introdujo en la celda de extracción (E). Posteriormente se permitió el flujo de CO₂ desde el tanque, se encendió el sistema de calentamiento a través del CT1 y CT2 con sus respectivas termocouplas, y se puso en funcionamiento la bomba de presión B1. Una vez alcanzadas la presión y temperatura de extracción se abrió la BPR hasta alcanzar un flujo de salida de CO₂ de 5 L/min al frasco colector. Finalmente se encendió la B2 para dosificar el cosolvente etanol (EtOH) y dar inicio a la extracción.

La curva de extracción (CE) fue obtenida a una presión de 20 MPa, temperatura de 50°C y 5% de porcentaje de cosolvente (condiciones intermedias de los factores de extracción). Para ésta, se recolectaron fracciones a tiempos previamente establecidos: cada 5 min por 30 min, cada 10 min por 60 min, cada 30 min por 150 min y cada 60 min por 180 min (Benelli, Riehl, Smania, Smania, & Ferreira, 2010).

3.2.2 Extracción Soxhlet

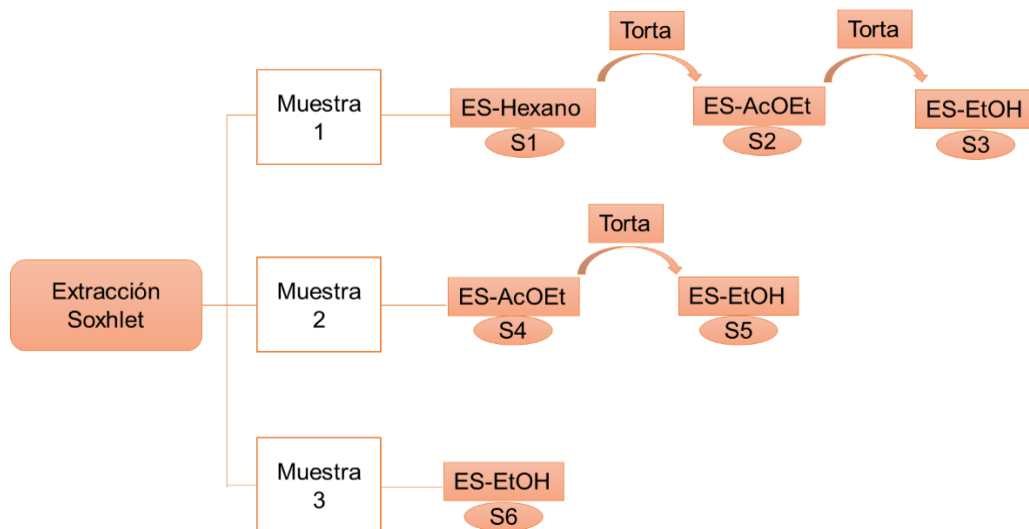
Se emplearon de 5.00 a 7.00 ± 0.01 g de muestra (por cada alga) y los disolventes hexano, acetato de etilo (AcOEt) y etanol (EtOH). Cada muestra previamente pesada, fue puesta en un dedal de celulosa y posteriormente ubicada en el extractor Soxhlet, con aproximadamente 250 mL de disolvente. Se conectó al equipo de extracción una bomba de vacío que permitía graduar la presión. En la tabla 2-1 se presentan las condiciones de extracción empleadas para cada disolvente, las extracciones se realizaron durante 7 h.

Tabla 3-1. Condiciones de extracción empleadas con Soxhlet a presión reducida.

Disolvente	Temperatura (°C)	Presión (atm)
Hexano	35	0.30
AcOEt	38	0.23
EtOH	40	0.18

De acuerdo con la figura 2-3, se sometió a extracción una muestra (Muestra 1) con hexano, obteniéndose el extracto etiquetado como S1. De manera sucesiva, a la torta de la Muestra 1 (previamente desengrasada con hexano) se sometió a extracción con AcOEt obteniéndose el extracto S2, y finalmente la torta resultante se sometió a extracción con EtOH, obteniéndose el extracto S3. Otra muestra (Muestra 2) se sometió a extracción con AcOEt, obteniéndose el extracto S4, la torta resultante de la Muestra 2, se sometió a extracción con EtOH, obteniéndose el extracto S5. Una tercer muestra (Muestra 3) se sometió únicamente a extracción con EtOH obteniéndose el extracto S6.

Figura 3-3. Metodología de extracción Soxhlet a presión reducida.



3.3 Actividad antioxidante en aceite vegetal comestible

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos se realizó en un aceite vegetal comestible, con el fin de determinar si los extractos ofrecían protección frente a la oxidación lipídica de dicho aceite. Esto último se logró monitoreando algunos productos de la oxidación lipídica, como HPL y TBARS. Se trabajó con un aceite libre de antioxidantes, constituido por 70% aceite de soya y 30% oleína de palma, tipo RBD (refinado, blanqueado y desodorizado), proporcionado por la empresa Team Foods. La elección de este aceite se debió a que el aceite de cocina más empleado en Colombia, corresponde a la mezcla de aceites vegetales comestibles (Ramírez et al., 2012).

3.3.1 Oxidación acelerada del aceite vegetal comestible

La metodología empleada para someter el aceite a oxidación se basó en reportes previos en los cuales se evaluó el efecto de algunos antioxidantes, durante el almacenamiento de aceites en condiciones de oxidación acelerada, con algunas modificaciones (Athukorala et

al., 2005; Ganthavorn & Hughes, 1997; Karawita et al., 2005; Mohdaly, Smetanska, Ramadan, Sarhan, & Mahmoud, 2011).

En frascos ámbar se pesó 20.00 g de aceite y se adicionó cloruro ferroso en etanol hasta alcanzar una concentración de 3.5 ppm del ión Fe^{+2} . Los extractos obtenidos, los antioxidantes sintéticos butilhidroxylueno (BHT), terbitilhidroxyquinona (TBHQ) y el antioxidante de origen natural ácido gálico (AG), cada uno por separado, se solubilizaron en etanol y se agregó cada uno, en frascos ámbar previamente preparados con el aceite y el cloruro ferroso, hasta alcanzar una concentración de 200 ppm del antioxidante en el aceite (FAO, 2015; Ministerio de salud de Colombia, 1991). Para la muestra control, se adicionó etanol a uno de los frascos ámbar previamente preparados con el aceite y el cloruro ferroso. Las muestras (adicionadas con extractos, TBHQ, BHT, AG y Control) fueron almacenadas en un horno a 70 °C por 6 días, se les aplicó burbujeo de aire con bomba de pecera 4 veces al día, por 5 min. Con el fin de hacer seguimiento al proceso oxidativo del aceite, se realizó la determinación de HPL y TBARS los días de oxidación 2, 4 y 6.

3.3.2 Medida de hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL)

Los hidroperóxidos, como producto primario de la oxidación de los PUFAs, dan lugar a la formación de dienos conjugados, los cuales absorben radiación UV a 234 nm (Gordon, 2001). Según el procedimiento descrito por algunos autores, con algunas modificaciones, 50 mg del aceite oxidado se mezcló y homogenizó con 500 μL de isooctano, posteriormente 20 μL de la mezcla anterior se diluyeron en 2 mL de isooctano, finalmente se agitó y se midió la absorbancia a 234 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10 (Thermo-Scientific) (Castro et al., 2013; Frankel, Huang, Kanner, & German, 1994). Para calcular la concentración de HPL, expresada como mmol de ácido linoleico/kg aceite, se empleó el coeficiente de extinción molar (ϵ) de los HPL, igual a 26000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Frankel et al., 1994). Los resultados también se expresan como porcentaje de inhibición tomando la concentración de cada extracto $[\text{HPL}]_e$ y la concentración del control $[\text{HPL}]_c$, de acuerdo a la ecuación 2-1 (Hernández, Castro, & Parada, 2011).

Ecuación 3-1. Porcentaje de inhibición de HPL

$$\% \text{ inhibición de HPL} = \frac{[\text{HPL}]_c - [\text{HPL}]_e}{[\text{HPL}]_c} \times 100$$

3.3.3 Medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

La medida de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico-TBARS se realizó con base a procedimientos planteados por varios autores (Castro, 2013; Karawita et al., 2005; Pan et al., 2007; Wang et al., 2011), con algunas modificaciones. Se pesó 50 mg del aceite oxidado y se agregó una disolución etanólica de TBHQ (23 mM), 5 mL de ácido tricloroacético (0.30 M en HCl 0.2 N) y una disolución acuosa de ácido tiobarbitúrico (26 mM). La mezcla se puso a calentar en baño de agua a 80-85 °C por 40 min. Posteriormente se enfriaron las muestras entre 0 - 4 °C por 30 min. Se tomó una alícuota de 3 mL y se mezcló con 3 mL de diclorometano, luego se centrifugó a 5500 RPM a temperatura ambiente por 10 min y finalmente, la absorbancia del sobrenadante color rosado, se midió en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10 (Thermo-Scientific) a 532 nm. Para el blanco espectrofotométrico, se realizó el procedimiento ya descrito, sin adición de muestra. La medida se expresa como mg MDA/ kg aceite, de acuerdo a la curva de calibración realizada con 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP) previamente hidrolizado en HCl, a concentraciones desde 103.133 a 773.499 μM ($y = 0.001x + 0.010$, $R^2 = 0.997$). El porcentaje de inhibición de formación de TBARS, se calcula de acuerdo con la ecuación 2-2, donde $[\text{TBARS}]_c$ es la concentración de TBARS del control y $[\text{TBARS}]_e$ es la concentración de TBARS encontrada en cada extracto (Athukorala et al., 2005; Iqbal, Haleem, Akhtar, Zia-ul-Haq, & Akbar, 2008).

Ecuación 3-2. Porcentaje de inhibición de TBARS

$$\% \text{ inhibición de TBARS} = \frac{[\text{TBARS}]_c - [\text{TBARS}]_e}{[\text{TBARS}]_c} \times 100$$

3.4 Contenido total de fenoles (CTF)

El contenido total de fenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, con algunas modificaciones (Echavarría et al., 2009; Frikha, Kammoun, Hammami, et al., 2011; Machu et al., 2015). Este método se basa en la reducción de los ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico ($H_3[P(W_3O_{10})_4]$ y $H_3Mo_{12}O_{40}P$) hasta sus óxidos (W_8O_{13} y Mo_8O_{23}) de color azul en medio básico, esto debido a la oxidación de los compuestos fenólicos (Castro, 2013). Se empleó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac) al 10% p/v en disolución acuosa y los extractos reconstituidos a 8 mg/mL en etanol. 100 μ L de cada extracto se mezclaron con 750 μ L del reactivo de Folin, cinco minutos después se agregó 750 μ L de una solución acuosa de carbonato de sodio al 6% y se dejó en reposo por 90 min en oscuridad. Seguidamente se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10 (Thermo-Scientific). La concentración de fenoles se expresó como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de alga seca (mg-EAG/g bs). Todas las medidas se hicieron por triplicado. Se empleó ácido gálico como estándar para la curva de calibración, con concentraciones desde 0.020 a 0.190 mg/mL ($y = 4.897x + 0.027$, $R^2 = 0.996$).

3.5 Contenido total de caroteno (CTC)

El β -caroteno es un cromóforo que presenta dobles enlaces conjugados, siendo susceptible de absorber radiación electromagnética en la región del espectro visible a una longitud de onda que se reporta entre los los 450 nm y 480 nm. El procedimiento experimental se basó en el método de Parsons & Strickland (1963) con modificaciones reportadas por otros autores (Romero et al., 2008; Szydłowska-Czerniak, Trokowski, Karlovits, & Szłyk, 2011). Se tomaron 5 mg aproximadamente de cada extracto seco y se agregó 2 mL de acetona/ H_2O al 90%, posteriormente se centrifugó por 10 min a 4 °C y 14000 revoluciones por minuto. Se hicieron lavados sucesivos del precipitado con el mismo procedimiento hasta decolorar. Los lavados de cada extracto se reunieron y se llevó a volumen (10 mL) con acetona. La absorbancia se midió a 480 nm contra acetona como blanco en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 10 (Thermo-Scientific). El resultado final

se expresó como miligramos de carotenos por gramo de alga seca (mg carotenos/g bs). Se empleó β -caroteno tipo I sintético, $\geq 93\%$ (UV) (Sigma Aldrich) para realizar la curva de calibración, con concentraciones desde 0,0005 a 0,0035 mg/mL ($y = 70.524x - 0.0053$, $R^2 = 0.996$). Todas las medidas se hicieron por triplicado.

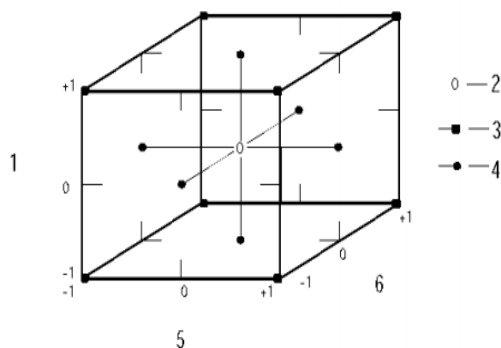
3.6 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental de la extracción Soxhlet fue completamente al azar, mientras que el diseño de la extracción EFS se describe a continuación:

En la EFS se tomaron como factores la presión, temperatura y el porcentaje de cosolvente a tres niveles, para lo cual se empleó un diseño central compuesto, con el fin de minimizar el tiempo y costos en comparación con otros diseños.

La región experimental se delimitó por los tres factores a tres niveles (ver figura 2-4): la presión a 10 MPa (-), 20 MPa (0) y 30 MPa (+), la temperatura a 40 °C (-), 50 °C (0) y 60 °C (+) y el porcentaje de cosolvente al 2% (-), 5% (0) y 8% (+). En la figura 2-4 se observan ocho puntos factoriales que corresponden a los vértices del cubo, seis puntos axiales que corresponden al centro de cada cara ($\alpha=1$) y un punto central que corresponde al centro del cubo, del cual se realizaron cinco réplicas (ver tabla 2-2).

Figura 3-4. Diseño central compuesto para tres factores a tres niveles -1, 0, +1.



Siendo:

- | | |
|-----------------------|-----------------------|
| 1. Factor presión | 4. Puntos axiales |
| 2. Punto central | 5. Factor temperatura |
| 3. Puntos factoriales | 6. Factor % EtOH |

Fuente: (Napolitano, 2001)

Tabla 3-2. Diseño experimental de EFS.

Extractos	Factores		
	Presión	Temperatura	EtOH
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+
9	-	0	0
10	+	0	0
11	0	-	0
12	0	+	0
13	0	0	-
14	0	0	+
15	0	0	0

Para el análisis estadístico, las variables CTF, CTC y la AA fueron medidas por triplicado y se reportaron como la media y su desviación estándar, mientras que el porcentaje de rendimiento no tuvo replicas en la EFS. El análisis de las diferencias estadísticas de los datos obtenidos en el CTF y el CTC, se realizó a través de un ANOVA simple, empleando el software STATGRAPHICS XVI.II versión 16.02.0004. Las diferencias estadísticas de la variable AA, medida a través de (HPL) y (TBARS), se realizó con un análisis de varianza por medidas repetidas (RANOVA), con el programa IBM SPSS Statistics 23. Por otro lado se realizaron pruebas de correlación entre el CTF, CTC y la actividad antioxidante mediante pruebas de correlación de Pearson empleando el software STATGRAPHICS XVI.II versión 16.02.0004.

4. Resultados y análisis

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son presentados a continuación, se inicia con el alga *G. mammillaris*, presentando la curva de extracción para la EFS, posteriormente la actividad antioxidante (HPL y TBARS) de sus extractos supercríticos (EFS), seguidos de los resultados para Soxhlet a presión reducida (ESPr), y se realiza una comparación de la AA por ambas metodologías de extracción. Luego se presentan los resultados obtenidos para el porcentaje de rendimiento, contenido total de fenoles (CTF), contenido total de caroteno (CTC) para ambas metodologías de extracción. Posteriormente se presenta un estudio de correlación entre la AA de los EFS y los ESPr con el CTF y el CTC. Se sigue el mismo esquema de presentación de resultados para el alga *H. musciformis*. Finalmente se comparan los mejores resultados obtenidos entre las dos algas.

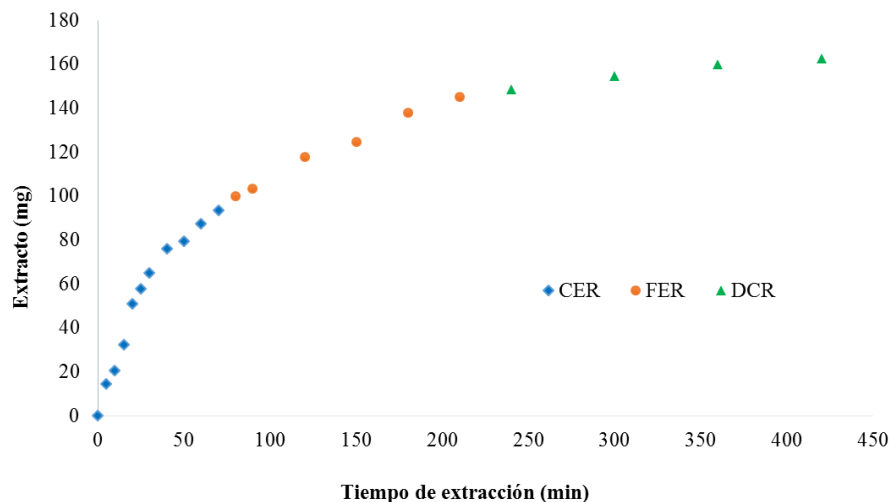
4.1 Resultados para el alga *G. mammillaris*

4.1.1 Curva de extracción con fluidos supercríticos

En la figura 3-1 se presenta la CE obtenida mediante EFS para el alga *G. mammillaris*, en ésta se observa que el periodo de tasa de extracción constante (CER – Constant Extraction Rate Period) fue entre los 0 – 70 min, proporcionado un rendimiento del 58% (93 mg de 162 mg bs totales). Esto se debe a que los solutos en la superficie de las partículas del alga fueron fácilmente accesibles para el disolvente (CO₂/EtOH), mediante procesos convectivos (Pereira & Meireles, 2010). Entre los 80 – 210 min se presentó el periodo de tasa de decaimiento de extracción (FER – Falling Extraction Rate Period), donde el

rendimiento de extracción fue del 32% (52 mg), ya que los procesos de difusión empiezan a controlar la transferencia de masa. Finalmente, el periodo de tasa controlada por procesos difusivos (DCR – Diffusion Controlled Rate Period), representó el 11% (18 mg), y se observó entre los 240 y 420 min. Cabe resaltar un comportamiento asintótico de la figura en DCR, debido a que el disolvente ingresa a las partículas del alga por difusión, y posteriormente el soluto más el disolvente regresan a la superficie, lo que hace menos productivo el proceso extractivo (Mendiola, Herrero, Castro, & Ibáñez, 2013; Pereira & Meireles, 2010).

Figura 4-1. Cinética de extracción con el alga *G. mammillaris* a 30 MPa, 50°C y 5% EtOH.



De acuerdo con lo anterior se seleccionó 240 min como el tiempo de extracción para el alga *G. mammillaris*, correspondiente al 91.38% del extracto total. A 240 min se incluyeron las etapas CER, FER y parte de DCR, con el fin de obtener la mayor cantidad de extracto, debido a que la extracción a los 420 min presentó un bajo rendimiento (1.16% de 162 mg bs).

4.1.2 Actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFS y ESPr

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, se realizó en un aceite vegetal comestible (mezcla soya y oleína de palma), con el fin de determinar la protección frente a la oxidación lipídica. Se realizó el seguimiento a los hidroperóxidos del ácido linoléico (HPL) y las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), por 6 días (medidos a los 0, 2, 4 y 6 días), de acuerdo con el procedimiento descrito en la metodología. Estos resultados se compararon con un CONTROL (muestra de aceite sin adición de antioxidantes), dos antioxidantes sintéticos (BHT y TBHQ) y el antioxidante natural ácido gálico (AG).

- Actividad antioxidante de extractos EFS

En la tabla 3-1 se presentan los resultados obtenidos en la medida de HPL y TBARS para el alga *G. mamillaris*. En general todos los extractos y antioxidantes usados como referencia mostraron una reducción en la protección del aceite a lo largo del tiempo, sin embargo, se observa que las concentraciones de HPL y TBARS fueron, en todos los casos, menores a la del Control. Esto sugiere que todos los extractos del alga *G. mamillaris* protegieron el aceite de la oxidación en sus etapas inicial y final, ya que las concentraciones encontradas de HPL y TBARS son menores al control (tabla 3-1) y presentan diferencias significativas (tablas 3-2 y 3-3). En comparación con los TBARS, los HPL presentaron menos diferencias significativas entre los extractos, lo cual se puede atribuir a la constante formación y degradación de los HPL. Estas medidas son representativas de la capacidad de los extractos para proteger al aceite de la oxidación lipídica en su etapa inicial (a través de los HPL) y en su etapa intermedia y final (a través de los TBARS).

Tabla 4-1. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con EFS de *G. mamillaris* y antioxidantes sintéticos.

Ext	HPL (mmol HPL/kg aceite)			TBARS (mg MDA/kg aceite)		
	Día 2	Día 4	Día 6	Día 2	Día 4	Día 6
1	12.62±0.45	25.02±0.77	33.34±1.79	2284.84±91.99	2501.27±12.36	2926.67±84.62
2	10.88±0.30	22.49±0.29	32.47±0.63	1859.01±96.49	2390.53±105.86	2794.21±35.28
3	11.12±0.36	23.25±0.30	35.05±1.05	2272.16±106.03	2573.52±71.90	3029.20±77.32
4	10.72±0.59	22.65±0.62	32.28±1.18	2158.33±86.26	2557.66±104.22	2886.97±34.51
5	11.45±0.59	23.90±1.19	33.39±1.11	1816.29±83.04	2134.20±71.50	2490.25±61.94
6	10.41±0.30	21.43±0.61	30.64±1.38	1428.98±20.45	1852.76±58.39	2188.35±44.06
7	10.31±0.57	23.35±0.63	34.97±0.59	1944.96±73.23	2237.42±71.57	2604.67±61.32
8	9.43±0.48	20.58±0.43	29.59±0.31	1321.34±64.26	1898.57±68.02	1985.37±89.73
9	12.05±0.39	24.20±0.11	35.21±0.68	2332.82±81.29	2452.70±70.05	2855.64±39.08
10	11.86±0.57	24.05±0.79	33.53±0.66	1660.97±21.39	2223.92±83.45	2641.20±100.89
11	11.35±0.63	24.00±0.93	34.38±1.06	2079.16±62.39	2373.79±62.20	2776.13±73.18
12	10.71±0.19	22.43±0.81	34.88±1.35	2011.78±14.28	2155.58±71.76	2579.34±95.16
13	11.83±0.35	23.62±0.21	33.88±1.41	2117.24±68.09	2510.51±99.25	2959.51±29.11
14	10.18±0.48	22.92±0.25	34.76±0.42	1354.70±18.44	1887.98±85.61	2465.05±70.65
15	12.21±1.68	25.00±0.57	35.17±1.06	1738.28±137.10	2218.14±77.06	2607.38±97.18
TBHQ	5.71±0.39	11.96±0.56	20.07±0.49	682.31±39.75	985.83±50.82	1412.21±55.45
BHT	8.81±0.40	20.68±0.38	29.23±0.92	1576.23±38.25	2136.23±116.12	2718.84±131.99
AG	2.70±0.19	7.55±0.18	11.79±0.89	350.91±13.74	597.99±37.99	936.31±77.98
Control	14.33±0.75	28.30±1.28	38.71±0.86	2865.50±58.79	3099.23±70.64	3428.83±67.16

Resultados expresados como el promedio \pm desviación estándar $n=3$. HPL en el día cero fue 11.05 ± 0.95 mmol HPL/Kg aceite. TBARS en el día cero fue de 369.96 ± 0.82 mg MDA/Kg aceite.

Tabla 4-2. Diferencias estadísticas de producción de HPL con EFS de *G. mammillaris*.

Extractos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TBHQ	AG	BHT
2	*																	
3																		
4	*																	
5																		
6	*		*		*													
7						*												
8	*	*	*	*	*		*											
9		*		*		*		*										
10						*		*										
11						*		*										
12						*		*										
13						*		*										
14						*		*										
15		*		*		*		*				*		*				
TBHQ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
AG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
BHT	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CONTROL	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni.

Tabla 4-3. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con EFS de *G. mammillaris*.

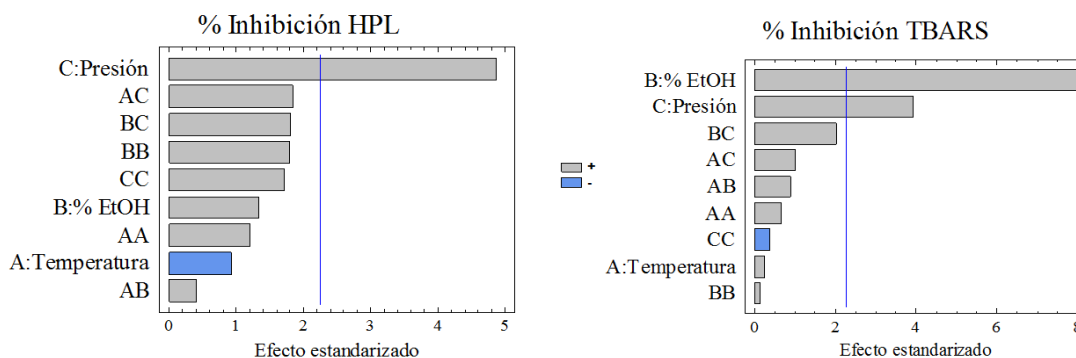
Extractos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TBHQ	AG	BHT
2	*																	
3		*																
4		*																
5	*	*	*	*														
6	*	*	*	*	*													
7	*		*	*		*												
8	*	*	*	*	*		*											
9		*			*	*	*	*										
10	*	*	*	*		*		*	*									
11	*		*		*	*		*		*								
12	*		*	*		*		*	*		*							
13		*			*	*	*	*		*		*						
14	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*					
15	*	*	*	*		*		*	*		*		*	*				
TBHQ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
AG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
BHT	*	*	*	*		*		*	*		*		*	*		*	*	
CONTROL	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni

Al comparar la AA de los diferentes extractos se observa que los extractos 6 (30 MPa, 40 °C y 8% EtOH) y 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH), fueron los que inhibieron en mayor medida la formación de HPL y TBARS, en comparación con los demás extractos y el BHT. De acuerdo a la tabla 3-1, en la concentración de HPL no hay diferencia estadística entre BHT y los extractos 6 (30 MPa, 40 °C y 8% EtOH) y 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH), aunque el BHT presenta una inhibición levemente más alta (24.50%) a la formación de HPL durante los seis días, que el tratamiento 8 (23.57%) y el 6 (20.86%). Los extractos 5, 7, 10, 12 y 15 no presentaron diferencias con BHT, en la concentración de TBARS, no obstante en la tabla 3-1 se evidencia que la concentración de dichas especies, fue menor en los extractos 6 (30 MPa, 40 °C y 8% EtOH), 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH) y 14 (20 MPa, 50 °C y 8% EtOH), por ello presentan diferencias significativas. Sin embargo, todos los extractos presentan diferencias estadísticas con el AG y TBHQ, lo que indica que ninguno igualó o superó la protección ofrecida por dichos antioxidantes sintéticos.

Con los datos de las variables de respuesta HPL y TBARS en el día 6 de oxidación, obtenidos para los extractos EFS, se determinó la influencia que ejercieron en estas variables los factores de extracción (presión, temperatura y % de cosolvente) y sus niveles. Para ello los datos se ajustaron a un modelo cuadrático y la ecuación que lo describe (Anexo A), permitió caracterizar la superficie de respuesta, conocer los coeficientes de regresión de los factores, su interacción y su doble interacción, cuyos p-valor indican la influencia de las contribuciones de los coeficientes de regresión en el modelo (Anexo A). El modelo estadístico ajustó los datos experimentales de HPL con R^2 : 87.12 y error 2.26; de TBARS con R^2 : 90.48 y error 3.31. Estos ajustes son aceptables para validar el modelo cuadrático empleado, explicar la influencia de los factores de extracción en la AA y el efecto de los niveles de cada factor a través de las superficies de respuesta. En la figura 3-2 se presenta el diagrama de Pareto obtenido, las barras grises indican un efecto principal de incremento y las barras azules de descenso en la AA, para los tres factores y sus interacciones. Se observa que la presión ejerció el principal efecto en la obtención de antioxidantes que inhibieron los HPL, mientras que el % EtOH y la presión ejercieron un efecto significativo en la inhibición de la formación TBARS.

Figura 4-2. Efecto estandarizado de los factores de EFS en la AA de *G. mammillaris*.



En las figuras 3-3 y 3-4 se presentan las superficies de respuesta, en las cuales el color de la superficie indica un aumento o descenso en la respuesta (eje y), de acuerdo a la influencia que ejercen los factores presión, temperatura y % de EtOH. Cada figura de

superficies de respuesta presenta una escala de color, en la cual el cambio desde el azul, pasando por el verde, hasta el rojo indica que un aumento en la respuesta. En la figura 3-3 se observa que el aumento en el nivel de la presión aumenta la inhibición de los HPL; a 8% de EtOH y 60 °C, la superficie se curva hacia un ascenso en la respuesta (color rojo) si la presión es la máxima empleada. Por su parte, en la figura 3-4 se evidencia que el cambio de nivel en el porcentaje de etanol incrementa la capacidad de los extractos para atenuar la formación de TBARS. El mayor nivel en la presión, también influyó en la inhibición de éstas, sin embargo, no se observa un efecto significativo de la temperatura sobre la inhibición de las TBARS.

Figura 4-3. Superficies de respuesta para el % de inhibición de HPL versus factores de EFS con *G. mamillaris*.

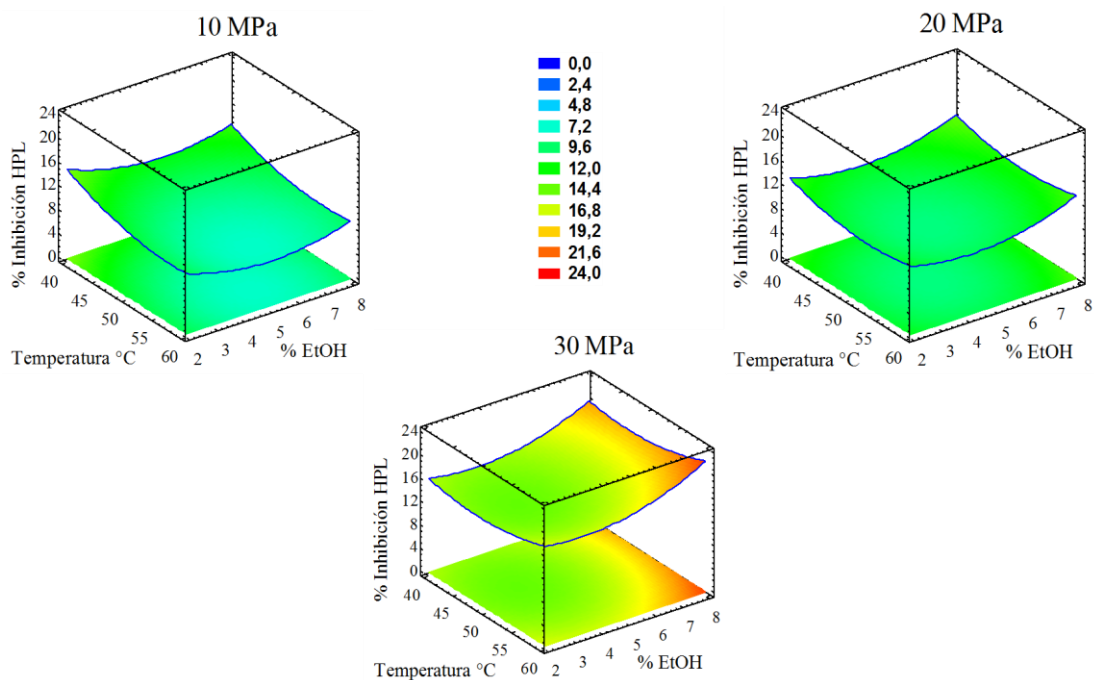
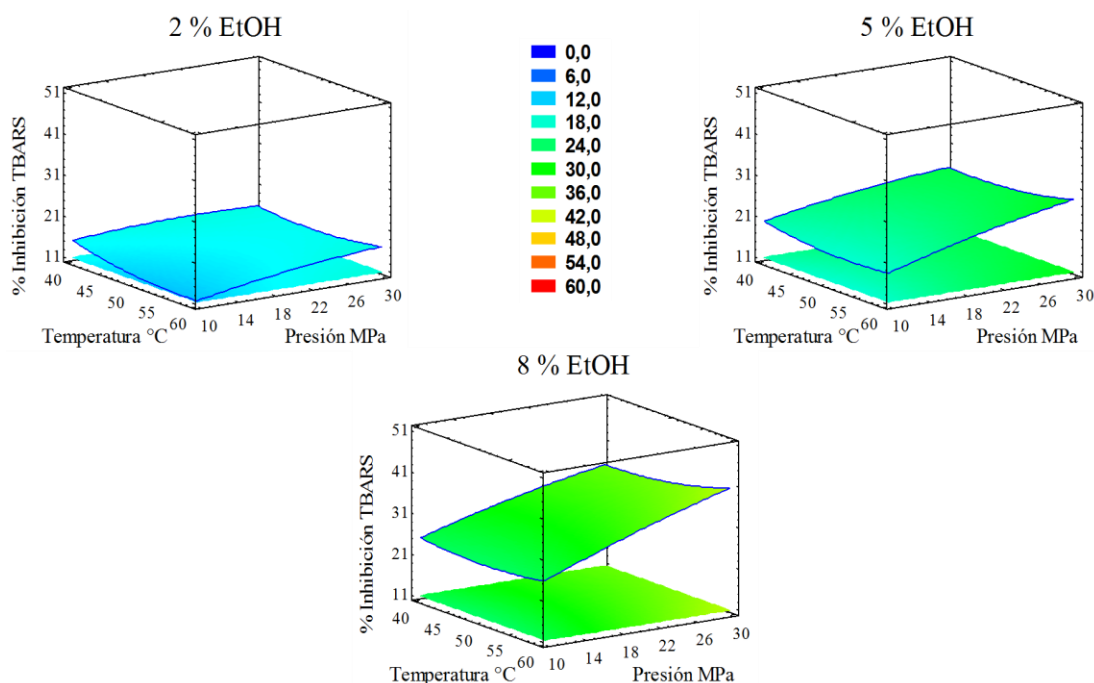


Figura 4-4. Superficies de respuesta para el % de inhibición de TBARS versus factores de EFS con *G. mamillaris*



La poca curvatura en la región para las superficies de respuesta de las figuras 3-3 y 3-4, implica que el diseño estadístico no está tomando en cuenta el punto que maximiza la respuesta, esto implica moverse en la región de operabilidad para encontrar dicho punto y curvar la región experimental (Gutiérrez & De la Vara, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, en la tabla 3-4 se presenta las condiciones más adecuadas para obtener extractos con la mejor AA, dentro de la región experimental estudiada. En la tabla 3-5 se observa el mínimo cambio en los niveles de los factores, para lograr un rápido ascenso en el % de inhibición de HPL y TBARS, así como su predicción. Esto, de acuerdo al modelo cuadrático empleado para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Tabla 4-4. Niveles de los factores que maximizan el % de inhibición en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo % inhibición HPL	Óptimo % inhibición TBARS
Presión (MPa)	30	30
EtOH (%)	8	8
Temperatura (°C)	60	60
Maximización	22.45	40.63

Tabla 4-5. Trayectoria de máximo ascenso en el % de inhibición con extractos de *G. mammillaris*.

Presión (MPa)		EtOH (%)		Temperatura (°C)		Predicción	
(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
20	20.00	5.00	5.00	50.00	50	9.03	22.46
25	20.60	5.54	7.62	49.58	51	11.73	32.86
30	27.03	6.24	8.91	49.85	52	16.23	39.07
35	20.00	7.05	9.91	50.55	53	22.85	44.54
40	30.73	7.92	10.78	51.51	54	31.78	49.72
45	32.30	8.85	11.56	52.66	55	43.18	54.73

(1) HPL (2) TBARS

De acuerdo con el análisis de Pareto, los niveles más altos de los factores presión y % de EtOH afectaron de forma significativa la inhibición de HPL y TBARS, lo cual corrobora el análisis realizado a partir de la tabla 3-1, donde los extractos 6 (30 MPa, 40 °C y 8% EtOH) y 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH), fueron los que inhibieron en mayor medida la formación de HPL y TBARS en el aceite ensayado.

- Actividad antioxidante de extractos Soxhlet a presión reducida

Los extractos obtenidos mediante ESPr corresponden a: **S1** extracto obtenido con hexano; **S2** extracto con AcOEt previa extracción con hexano; **S3** extracto con EtOH previa extracción con hexano y AcOEt; **S4** extracto obtenido con AcOEt; **S5** extracto con EtOH previa extracción con AcOEt; y **S6** extracto obtenido con EtOH (ver sección 2.2.2).

En la tabla 3-6 se observan los resultados correspondientes a la concentración de HPL y TBARS presentes en las muestras de aceite adicionada con los extractos Soxhlet obtenidos a partir de *G. mamillaris*. En general se observa que el contenido de HPL y TBARS fueron ascendentes durante los 6 días de oxidación. Todos los extractos fueron significativamente diferentes (ver tabla 3-7 y 3-8) al control, tanto en HPL como en TBARS, lo cual indica que protegieron en alguna medida el aceite en sus etapas inicial y final de oxidación. Sin embargo, todos los extractos también mostraron diferencias con los antioxidantes TBHQ y AG, éstos más eficientes, indicando que no superaron la protección lipídica ofrecida por estos dos antioxidantes. Los valores de porcentaje de inhibición de HPL y TBARS para los extractos de mediana y alta polaridad fueron entre 20 y 30%, siendo el extracto S4 (AcOEt) el que mayor porcentaje de inhibición presentó tanto de la formación de HPL (24.68%) como de TBARS (30.33%).

Tabla 4-6. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con extractos Soxhlet de *G. mamillaris* y antioxidantes sintéticos.

Extracto	HPL (mmol HPL/Kg aceite)			TBARS (mg MDA/Kg aceite)		
	Día 2	Día 4	Día 6	Día 2	Día 4	Día 6
S1	14.48±0.66	22.83±0.20	35.87±0.79	932.24±39.81	1148.48±59.15	1816.04±56.07
S2	12.67±0.59	20.31±0.21	32.99±1.12	809.76±28.53	1030.51±26.17	1632.35±69.30
S3	15.67±0.21	24.83±0.56	37.22±0.59	989.35±11.98	1200.69±25.14	1787.21±87.28
S4	11.84±0.61	20.58±0.59	30.70±0.37	673.84±29.01	921.11±31.08	1475.58±53.73
S5	15.68±0.44	25.17±0.45	39.30±0.49	973.84±28.92	1158.33±14.86	1807.55±29.10
S6	13.15±0.32	22.36±0.59	34.27±1.01	812.03±23.10	1046.01±41.92	1631.96±29.62
TBHQ	6.46±0.35	12.44±0.20	22.42±0.79	404.55±27.26	533.82±18.92	951.57±22.23
AG	3.80±0.32	8.15±0.47	16.62±0.56	192.92±13.18	359.02±10.57	649.11±19.53
Control	17.47±0.53	26.77±0.38	40.76±0.91	1200.55±37.99	1379.37±42.53	2117.80±69.12

Los valores son expresados como el promedio \pm la desviación estándar (n=3). En el día cero HPL fue 6.46 ± 0.89 mmol HPL/Kg aceite y TBARS 322.96 ± 0.49 mg MDA/Kg aceite.

Tabla 4-7. Diferencias estadísticas de producción de HPL con extractos Soxhlet de *G. mammillaris*.

Extractos	1	2	3	4	5	6	TBHQ	AG
S2	*							
S3	*	*						
S4	*		*					
S5	*	*		*				
S6	*	*	*	*	*			
TBHQ	*	*	*	*	*	*		
AG	*	*	*	*	*	*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*

*Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni.

Tabla 4-8. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con extractos Soxhlet de *G. mammillaris*.

Extractos	1	2	3	4	5	6	TBHQ	AG
S2	*							
S3		*						
S4	*	*	*					
S5		*		*				
S6	*		*	*	*			
TBHQ	*	*	*	*	*	*		
AG	*	*	*	*	*	*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*

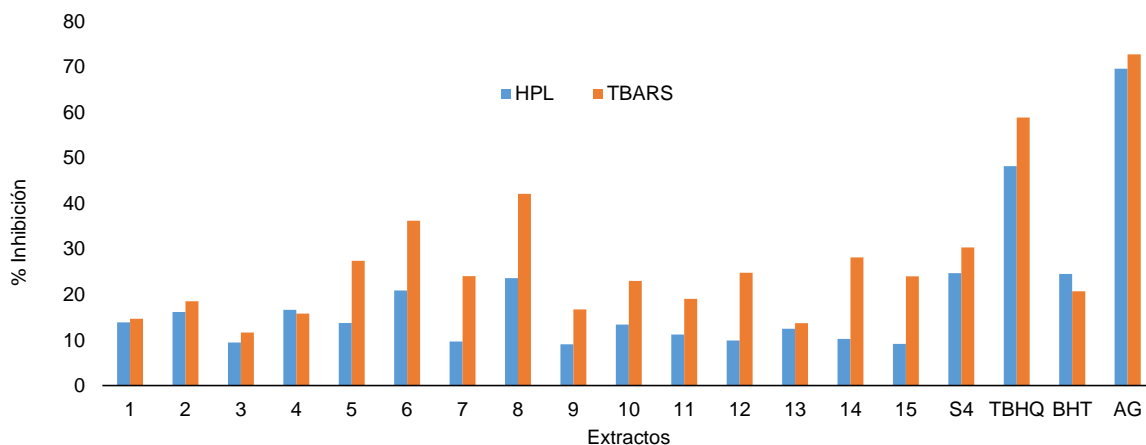
*Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni.

- Comparación de la AA entre extractos EFS y ESPr

Para comparar la AA de los extractos EFS con el extracto Soxhlet de mayor AA (S4), se presentan los correspondientes resultados para el día 6 de oxidación, ver figura 3-5. El extracto S4 presentó la mayor inhibición a los HPL (24.68%), seguido por el BHT (24.50%), el extracto 8 (23.53%) y el 6 (20.86%); en general la inhibición de los extractos supercríticos a los HPL es baja, mientras que la inhibición a los TBARS es mayor, los tratamientos 6 (36.18%) y 8 (42.10%) supercríticos superaron al extracto S4 (30.33%) y se confirma la baja inhibición de estas especies secundarias, por el antioxidante sintético BHT (20.71%). Dentro de la región experimental estudiada, las mejores condiciones de extracción de

antioxidantes de *G. mamillaris* para inhibir la etapa final de la oxidación lipídica en un aceite vegetal comestible, corresponde a la extracción supercrítica con los niveles de % de cosolvente y presión más altos (8% de EtOH y 30 MPa).

Figura 4-5. Porcentaje de inhibición de HPL y TBARS con extractos de *G. mamillaris*.



Comparando con otros estudios, el extracto metanólico de alga roja *Grateloupia filicina* fue adicionado a aceite refinado de pescado, y almacenado en un horno a 65 °C por 7 días, logrando una inhibición en la producción de TBARS cercana al 40% a los 6 días, superando al BHT (Athukorala et al., 2005). Aunque en la presente investigación se empleó un aceite menos susceptible a la oxidación (mezcla de soya y oleína de palma), el extracto supercrítico 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH) de *G. mamillaris*, superó dicha inhibición con el 42.10%, a pesar de que en el presente estudio, las condiciones de oxidación fueron más agresivas (adición de ion ferroso y 70 °C).

4.1.3 Rendimiento de extracción

En la tabla 3-9 se presentan los porcentajes de rendimiento en base seca (bs) para los extractos supercríticos y los extractos Soxhlet. Los rendimientos de los extractos EFS se presentan de acuerdo al diseño experimental planteado en la tabla 2-2 de la metodología.

Tabla 4-9. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *G. mammillaris* obtenidos mediante EFS y Soxhlet.

Extracto	Factores			% Rendimiento
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	0.10
2	30	40	2	0.88
3	10	60	2	0.36
4	30	60	2	0.53
5	10	40	8	1.51
6	30	40	8	1.71
7	10	60	8	1.40
8	30	60	8	3.03
9	10	50	5	0.42
10	30	50	5	0.74
11	20	40	5	0.51
12	20	60	5	0.63
13	20	50	2	0.34
14	20	50	8	1.03
15.1	20	50	5	0.54
15.2	20	50	5	0.60
15.3	20	50	5	0.81
15.4	20	50	5	0.58
15.5	20	50	5	0.73
S1				0.24 ± 0.02 a
S2				0.64 ± 0.03 b
S3				6.75 ± 0.08 f
S4				0.81 ± 0.03 g
S5				6.62 ± 0.09 f
S6				5.12 ± 0.03 h

Valores son expresados como el promedio ± la desviación estándar (n=3). Para los extractos Soxhlet, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey

De acuerdo a las dos técnicas extractivas, los disolventes de mayor polaridad, permitieron mayores rendimientos de extracción, lo cual sugiere la presencia de compuestos de polaridad intermedia en el alga. El extracto 8 (30 MPa, 60 °C y 8% EtOH) presentó el rendimiento más alto (3.03%) en la EFS. Los ESPr obtenidos con etanol: S3, S5 y S6 presentaron los rendimientos más altos para este método de extracción, sin diferencias significativas para S3 (etanólico previamente extraído con AcOEt y hexano) y S5 (previamente extraído con AcOEt). Esto sugiere que para los extractos del alga *G. mammillaris* las sustancias solubles en etanol, son mayormente liberadas luego de retirar compuestos de mediana y baja polaridad.

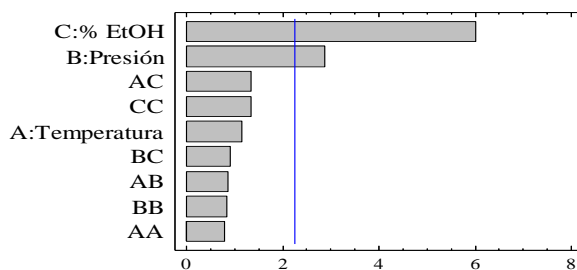
Comparando entre EFS y ESPr, la extracción Soxhlet con etanol (S6) presentó cerca del doble de rendimiento que el extracto 8, ya que características de la extracción Soxhlet, como la interacción biomasa-disolvente en el proceso de recirculación del disolvente, intervienen de manera significativa en el rendimiento de extracción (Andrade et al., 2012). Los extractos con condiciones intermedias y bajas de % de EtOH, presentaron rendimientos similares a los obtenidos con hexano y acetato de etilo mediante Soxhlet.

Comparando el porcentaje de rendimiento de los extractos EFS con otros estudios de EFS de macroalgas; Sivagnanam et al. (2015) obtuvieron con las macroalgas café, *Saccharina japónica* 1.09% (bs) y *Sargassum horneri* 1.41% (bs) (25 MPa, 45 °C, 10% EtOH), indicando que los rendimientos del presente estudio con el 8% de etanol presentaron rendimientos similares, a excepción del extracto 8 (3.03% bs).

En cuanto a la técnica convencional ESPr, comparando los porcentajes de rendimiento de los extractos etanólicos (S5 y S6) con el rendimiento de 6.5% en bs de extracto etanólico de un alga del mismo género -*Gracilaria verrucosa*- (Elalla & Shalaby, 2009), se observa que los rendimientos obtenidos en el presente estudio son similares.

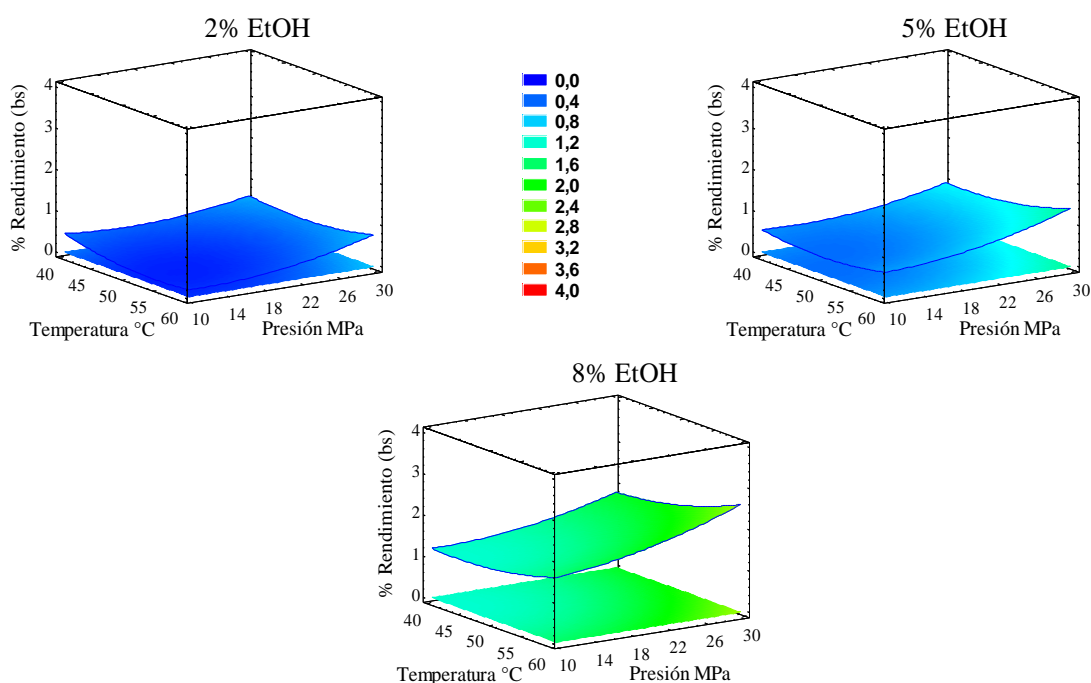
Para conocer la influencia de los factores de EFS (presión, temperatura y % de cosolvente) sobre el porcentaje de rendimiento de los extractos de *G. mammillaris*, se presentan los diagramas de Pareto (figura 3-6) y superficies de respuesta (figura 3-7). Las ecuaciones que ajustan los datos a su modelo cuadrático se reportan en el Anexo B junto con los coeficientes de regresión y sus significancias. El modelo estadístico ajustó los datos experimentales con R^2 : 73.97% y un error de 0.34.

Figura 4-6. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el % p/p de rendimiento (bs) de *G. mammillaris*.



Se observa que el porcentaje de EtOH (C) ejerció el efecto principal sobre el incremento del rendimiento, seguido de la presión (B), mientras que la temperatura no presentó un efecto significativo. La interacción temperatura-presión fue tomada en cuenta para construir las superficies de respuesta a los distintos niveles de cosolvente, ya que este último presentó el efecto principal en la respuesta (figura 3-7).

Figura 4-7. Superficies de respuesta del % de rendimiento versus factores de extracción EFS con *G. mamillaris*.



El aumento en el nivel de porcentaje de etanol y de presión influenció el rendimiento, sin apreciar un cambio significativo del rendimiento con los distintos niveles de temperatura. Sin embargo, se observa mayor rendimiento a 60 °C, con los niveles superiores de presión y % EtOH, debido a que se aumenta la presión de vapor de los solutos.

El cosolvente en su nivel más alto, incrementó la solubilidad, debido posiblemente a tres razones: (1) altera la estructura de la biomasa, causando hinchamiento y cambios que aumentan el acceso del disolvente a los solutos (Pereira & Meireles, 2010); (2) el aumento

de cosolvente incrementa la polaridad y densidad del disolvente, lo que permite mayor cantidad de interacciones dipolo/dipolo y puentes de hidrogeno con los solutos (Andrade et al., 2012; Díaz-Reinoso, Moure, Domínguez, & Parajó, 2006; Sapkale et al., 2010); (3) el cosolvente propicia la ruptura de interacciones biomasa-soluto, incorporandose en los sitios activos del sólido y solubilizando compuestos (Benelli et al., 2010).

La influencia de la temperatura depende de la presión a la cual se lleve a cabo el estudio, a presiones inferiores al posible punto de entrecruzamiento (15 MPa), el aumento de la temperatura disminuye el rendimiento, dado que la densidad del disolvente baja; en contraste, a presiones superiores a dicho punto, el aumento de temperatura aumenta el rendimiento, debido al incremento en la presión de vapor de los solutos; dicho comportamiento se conoce como retrogradación (Andrade et al., 2012; Benelli et al., 2010; Castro et al., 2013).

Por otra parte, dado que otros factores podrían afectar el rendimiento de EFS, tales como la morfología y ubicación del soluto en la biomasa, algunas características de la muestra (tamaño, forma y porosidad) podrían ser determinantes del rendimiento de extracción.

El análisis de los datos muestra el mejor tratamiento de la región experimental estudiada (tabla 3-10) y el trayecto a través del cual la respuesta estimada, % de rendimiento, cambia rápidamente hacía el ascenso, con el menor cambio posible en los factores experimentales (tabla 3-11).

Tabla 4-10. Niveles de los factores de EFS que maximizan el porcentaje de rendimiento en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	30
EtOH (%)	8
Temperatura (°C)	60
Valor óptimo % Rendimiento	2.61

Tabla 4-11. Trayectoria de máximo ascenso en el rendimiento de EFS de *G. mammillaris*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción rendimiento (%p/p (bs))
20.0	5.0	50.0	0.54
22.1	6.3	51.0	0.98
24.1	7.6	52.3	1.59
26.1	8.9	53.7	2.37
28.2	10.2	55.3	3.33
30.2	11.5	56.9	4.47

En conclusión, los mayores rendimientos para el alga *G. mammillaris* se obtuvieron en los extractos S3 y S5, los cuales duplicaron al rendimiento del extracto 8 EFS (3.03%, 30 MPa, 60°C, 8% EtOH), vale la pena recordar que este último extracto presentó la mayor actividad antioxidante. Las variables con un efecto más significativo en el rendimiento de los EFS fue el % de etanol y la presión en sus máximos niveles (8% EtOH y 30 MPa).

4.1.4 Contenido total de fenoles

En la tabla 3-12 se muestran los resultados de la determinación de CTF, en los extractos EFS de acuerdo al diseño experimental (extractos 1-15) y en los extractos Soxhlet (S1-S6). Con relación a los EFS, el mayor CTF corresponde al extracto 8, el cual se obtuvo empleando nivel más alto en los tres factores (30 MPa, 60°C, 8% EtOH), lo cual se puede atribuir a que la mayor concentración de cosolvente aumentó la polaridad del disolvente (CO₂/EtOH), permitiendo extraer mayor cantidad de compuestos fenólicos. Para los ESPr el CTF más alto corresponde al extracto obtenido con AcOEt (S4), seguido del extracto obtenido con etanol (S6), lo cual indica que son compuestos fenólicos afines por disolventes de mediana polaridad.

Tabla 4-12. CTF de los extractos de *G. mammillaris* obtenidos mediante EFS y Soxhlet.

Extracto	Factores			mg EAG/g alga (bs) <i>G. mammillaris</i>
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	0.368 ± 0.002 a
2	30	40	2	1.872 ± 0.018 bc
3	10	60	2	0.720 ± 0.007 d
4	30	60	2	1.749 ± 0.011 e
5	10	40	8	2.668 ± 0.021 f
6	30	40	8	3.641 ± 0.032 g
7	10	60	8	2.862 ± 0.025 h
8	30	60	8	3.791 ± 0.035 i
9	10	50	5	1.692 ± 0.016 e
10	30	50	5	2.701 ± 0.024 f
11	20	40	5	1.907 ± 0.015 c
12	20	60	5	2.464 ± 0.022 j
13	20	50	2	1.565 ± 0.014 k
14	20	50	8	3.272 ± 0.032 l
15	20	50	5	2.421 ± 0.020 j
S1				0.286 ± 0.003 a
S2				2.619 ± 0.024 f
S3				1.772 ± 0.032 eb
S4				3.919 ± 0.065 m
S5				2.622 ± 0.081 f
S6				3.486 ± 0.053 n

Valores son expresados como el promedio ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey.

El extracto S4 presenta el CTF más alto entre los extractos obtenidos por las dos técnicas extractivas con una diferencia estadísticamente significativa, seguido del extracto supercrítico 8. Cabe resaltar que el extracto Soxhlet con hexano S1 no presenta diferencia con el extracto supercrítico 1, sugiriendo que el menor nivel de los factores de extracción EFS pueden dar lugar a la misma capacidad de solubilización de compuestos fenólicos que ofrece el extracto S1 (hexano).

El CTF observado en los extractos obtenidos mediante EFS, es mayor al reportado en el estudio realizado por Sivagnanam et al. (2015), con las algas *Sargassum horneri* y *Saccharina japónica* (tabla 3-13).

Tabla 4-13. CTF reportado en la literatura para EFS de macroalgas.

Disolvente	CTF mg EAG/ g (bs)	Macroalga
SC-CO ₂ + etanol (25 MPa, 45 °C)	0.64 ± 0.01	<i>Sargassum horneri</i>
Etanol	0.43 ± 0.01	
Hexano	0.42 ± 0.02	
SC-CO ₂ + etanol (25 MPa, 45 °C)	0.60 ± 0.05	<i>Saccharina japónica</i>
Etanol	0.34 ± 0.05	
Hexano	0.28 ± 0.01	

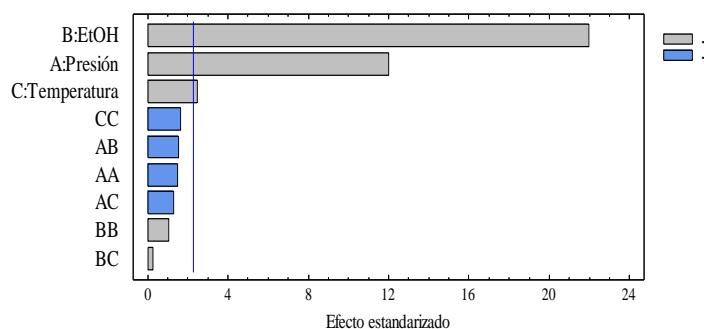
Comparando los resultados de CTF de los extractos Soxhlet con otros estudios de macroalgas del mismo género que emplearon técnicas convencionales de extracción (tabla 3-14), en el presente estudio los extractos de mediana polaridad presentaron mayor CTF que la mayoría de extractos etanólicos o metanólicos; sin embargo, no superaron el valor obtenido de CTF cuando la extracción del alga *Gracilaria chaggi* se hizo por 4 días de maceración.

Tabla 4-14. CTF reportado en la literatura para extracción con técnicas convencionales de macroalgas del género *Gracilaria*.

Disolvente	CTF mg EAG/ g (bs)	Macroalga	Referencia
Etanol	0.32 ± 0.05	<i>Gracilaria corticata</i>	(Sarojini, Sujatha, & Rao, 2016)
Metanol (maceración 4 días)	5.00	<i>Gracilaria chaggi</i>	(Sreenivasan, Ibrahim, & Kassim, 2007)
Metanol	0.35 ± 0.05	<i>Gracilaria bursa Pastoris</i>	(Yildiz, Vatan, Çelikler, & Dere, 2011)

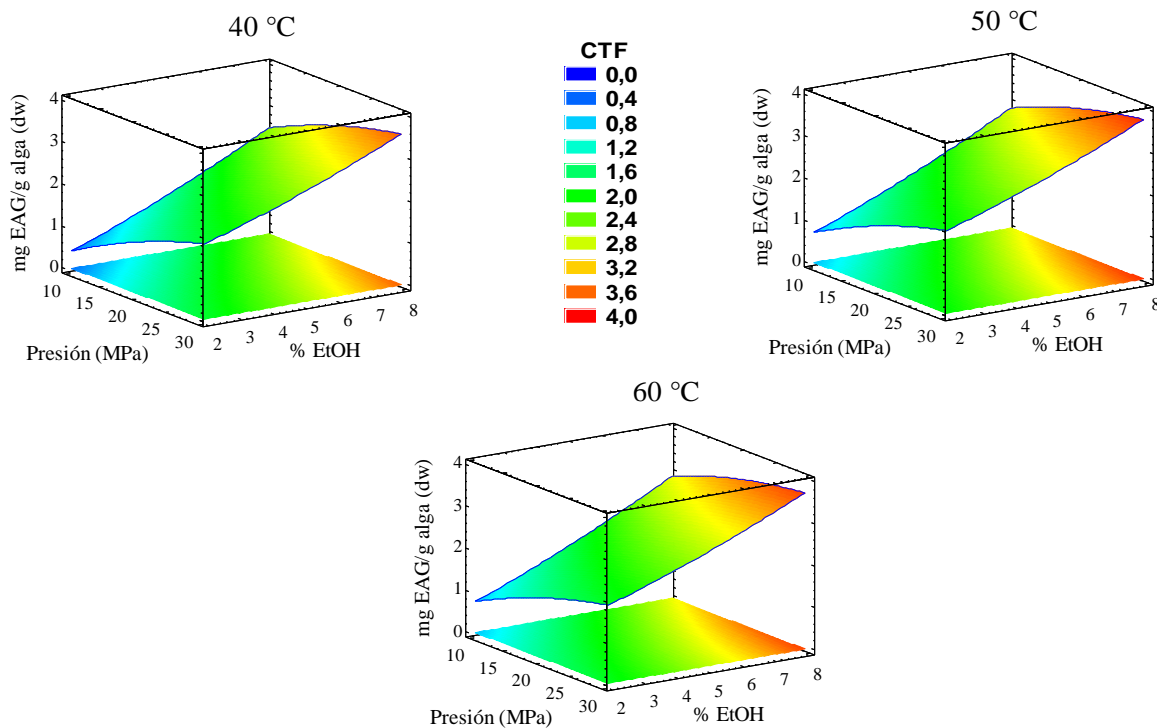
Para conocer la influencia de los factores de EFS (presión, temperatura y % de cosolvente) y sus niveles en el CTF de los extractos EFS de *G. mammillaris*, en la figura 3-8 se presenta el diagrama de Pareto y en la figura 3-9 las superficies de respuesta. En el Anexo C se reporta la ecuación que ajusta los datos al modelo cuadrático (R^2 : 98.63% y error: 0.14), los coeficientes de regresión y significancias.

Figura 4-8. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTF de *G. mamillaris*.



La presencia de etanol como cosolvente (B) ejerció el mayor efecto principal, seguido de la presión (A) y la temperatura (C). Las interacciones entre factores, así como las interacciones cuadráticas no presentaron un efecto significativo en esta variable respuesta. En la figura 3-9 se observa que en general el aumento en los niveles de presión y % EtOH incrementó el CTF; sin embargo, la temperatura a su máximo nivel induce a un leve descenso del CTF, debido posiblemente a que a temperaturas superiores a 50 °C algunos compuestos fenólicos pueden ser polimerizados u oxidados (Díaz-Reinoso et al., 2006). Al respecto es de resaltar que de acuerdo a Díaz-Reinoso et al. (2006) y Pilavtepe & Yesil-Celiktas (2013), el aumento en el nivel de presión y de cosolvente, aumenta la polaridad del CO₂-EtOH así como la densidad. Esto genera mayor atracción entre el disolvente y los grupos funcionales polares, debido a la formación de puentes de hidrógeno y efecto dipolo/dipolo, lo que estimula la extracción de compuestos polares con creciente peso molecular.

Figura 4-9. Superficies de respuesta del CTF versus factores de EFS con *G. mammillaris*.



En la tabla 3-15 se presenta el mejor tratamiento de la región experimental estudiada y el valor de CTF que se alcanzaría con los niveles de los factores propuestos. En la tabla 3-16 se observa el mínimo cambio en los niveles de los factores, para lograr un rápido ascenso en el CTF, así como su predicción. Esto, de acuerdo al modelo cuadrático empleado para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Tabla 4-15. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTF en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	30
EtOH (%)	8
Temperatura (°C)	52.53
Valor óptimo CTF	3.81

Tabla 4-16. Trayectoria de máximo ascenso en el CTF de EFS de *G. mammillaris*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción CTF
20	5.00	50.00	2.38
21	5.58	50.21	2.63
22	6.23	50.41	2.90
23	6.97	50.62	3.21
24	7.84	50.83	3.59
25	8.90	51.05	4.02

En conclusión, el CTF fue mayor en el extracto Soxhlet S4, seguido de los extractos supercríticos 8 y 6. En los EFS las variables que influenciaron significativamente la extracción de compuestos fenólicos fueron el % de cosolvente y la presión, en sus niveles máximos (8% EtOH y 30 MPa), y la temperatura a su nivel medio (50 °C).

4.1.5 Contenido total de carotenos

En la tabla 3-17 se presenta el CTC de la macroalga *G. mammillaris*, para los extractos EFS según el diseño experimental (1-15) y se comparan con los extractos obtenidos mediante soxhlet (S1-S6). Los resultados se expresan como miligramos de caroteno por gramo de alga, en base seca (mg C/g alga (bs)). En general, para los extractos EFS la presión en su nivel más alto, favoreció el mayor CTC. En los ESPr los contenidos de carotenos más altos se encontraron para extractos obtenidos con AcOEt (S2 y S4), lo cual indica que la mayoría de este grupo de compuestos fue aún por el disolvente medianamente polar. Los menores valores de CTC se encontraron en los extractos Soxhlet etanólicos, previa extracción con AcOEt (S3 y S5), debido a la afinidad de este último por los componentes del extracto.

Entre las dos técnicas extractivas, el contenido más alto de carotenos corresponde al extracto supercrítico 10 (30 MPa, 50 °C, 5 % EtOH), seguido del extracto Soxhlet S2 (AcOEt previamente extraído con hexano), y posteriormente del extracto EFS 12 (20 MPa, 60 °C, 5 % EtOH) que fue estadísticamente comparable al extracto S4 (AcOEt).

Tabla 4-17. CTC de los extractos de *G. mammillaris* obtenidos mediante EFS y Soxhlet.

Extracto	Factores			mg C/g alga (bs) <i>G. mammillaris</i>
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	0.597 ± 0.037 a
2	30	40	2	1.511 ± 0.072 b
3	10	60	2	0.447 ± 0.000 ja
4	30	60	2	1.479 ± 0.047 b
5	10	40	8	2.119 ± 0.063 c
6	30	40	8	2.158 ± 0.075 c
7	10	60	8	0.920 ± 0.071 d
8	30	60	8	2.214 ± 0.073 c
9	10	50	5	0.919 ± 0.041 d
10	30	50	5	5.038 ± 0.087 e
11	20	40	5	2.687 ± 0.075 f
12	20	60	5	3.987 ± 0.067 g
13	20	50	2	2.505 ± 0.061 f
14	20	50	8	2.670 ± 0.069 f
15	20	50	5	3.582 ± 0.059 h
S1				0.937 ± 0.088 d
S2				4.583 ± 0.072 i
S3				0.266 ± 0.027 j
S4				3.969 ± 0.072 g
S5				0.282 ± 0.027 j
S6				1.134 ± 0.055 k

Valores son expresados como el promedio ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey

Los resultados del CTC encontrados para los extractos supercríticos y Soxhlet fueron en su mayoría superiores a los reportados por la literatura (tabla 3-18) a excepción de los extractos Soxhlet S3 y S5, obtenidos con EtOH, previa extracción con AcOEt. Es de resaltar que el el número de investigaciones encontradas en las que cuantifican el contenido de carotenos en extractos de macroalgas obtenidos por EFS son bastante limitadas.

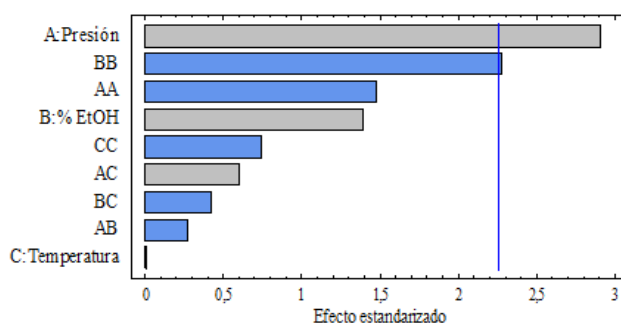
Tabla 4-18. CTC reportado en la literatura para algunas macroalgas.

Disolvente	Contenido de Caroteno (mg C/g muestra (bs))	Macroalga	Referencia
SC-CO ₂ 5% etanol (40 MPa, 55 °C)	0.055	<i>Ulva lactuca</i> *	(Parjikolaei et al., 2014)
Acetona	0.431	<i>Gracilaria corticata</i> **	(Thinakaran & Sivakumar, 2012)
Éter de petróleo	0.054	Gracilaria. Changgi**	(Norziah & Ching, 2000)
Dietil eter	0.07	<i>Pterocladia capillacea</i> **	(Khairy & El-Sheikh, 2015)

* Macroalga verde

** Macroalga roja

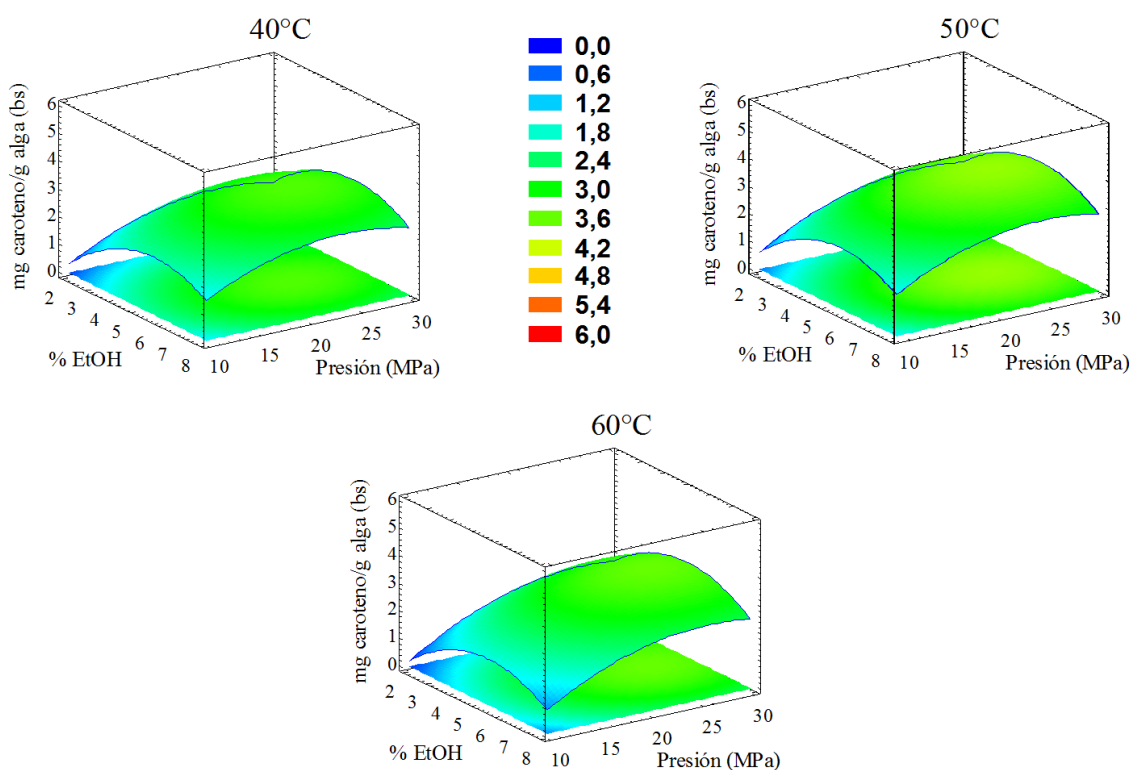
La influencia de los factores de EFS (presión, temperatura y % de cosolvente) sobre el CTC de los extractos EFS de *G. mammillaris* se presenta en el diagrama de Pareto (figura 3-8) y las superficies de respuesta (figura 3-9). La ecuación que ajusta los datos a su modelo cuadrático (R^2 : 80.46% y error 0.80), se reporta en el Anexo D junto con sus coeficientes de regresión y significancia. El efecto principal de incremento en la variable CTC fue ejercido por el factor presión, si bien el % de EtOH no ejerció un efecto principal, este factor mostró un efecto de ascenso en la respuesta de CTC.

Figura 4-10. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTC de *G. mammillaris*.

Con la presión se observa, que el incremento en su nivel hasta los 25 MPa aproximadamente, genera un aumento del CTC y de la curvatura de la región estudiada, lo cual se favorece más a condiciones intermedias de temperatura, esto puede indicar que

primó la densidad en el arrastre de compuestos carotenoides, debido a su alto peso molecular. Cuando la temperatura aumenta de 40 a 50 °C, se observa un leve aumento del CTC, lo cual se podría relacionar con la explicación de Pina et al. (2014), quienes afirman que el aumento de la temperatura induce una mejor disponibilidad de los carotenoides, porque inactivan las enzimas que oxidan los carotenos; sin embargo, a 60 °C disminuye nuevamente el CTC.

Figura 4-11. Superficies de respuesta del CTC versus factores de EFS con *G. mammillaris*.



También se observa que el menor porcentaje de cosolvente, así como su nivel más alto, generan una disminución en el CTC, por lo que la máxima curvatura para este eje está dada entre el 4 y 6% de EtOH. Algunos autores (Herrero et al., 2006, 2015) reportan que el uso de cosolvente incrementa la cantidad de carotenos extraídos, comparado con la extracción empleando únicamente CO₂, debido a las interacciones electrostáticas que se forman entre los dipolos transitorios de la estructura de los carotenos, y el dipolo formado por el oxígeno y el carbono del grupo alcohol. Por otro lado, los mismos autores explican

que los carotenos polares y no polares también generan fuerzas de atracción de Van der Waals entre ellos, lo cual influye en la extracción de carotenos en disolventes polares.

En la tabla 3-19 se presenta el mejor tratamiento de la región experimental estudiada y el valor de CTC que se alcanzaría con los niveles de los factores propuestos. En la tabla 3-20 se observa el mínimo cambio en los niveles de los factores, para lograr un rápido ascenso en el CTC, así como su predicción. Esto, de acuerdo al modelo cuadrático empleado, para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Tabla 4-19. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTC en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	25.20
EtOH (%)	5.41
Temperatura (°C)	50.98
Valor óptimo CTC	3.85

Tabla 4-20. Trayectoria de máximo ascenso en el CTC de EFS de *G. mammillaris*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción CTC
20	5.00	50.00	3.63
21	5.13	50.01	3.71
22	5.25	50.03	3.77
23	5.34	50.10	3.81
24	5.40	50.24	3.83
25	5.42	50.64	3.85

En conclusión, con el extracto EFS 10 se obtuvo el mayor CTC, seguido del extracto Soxhlet S2 (AcOEt previamente extraído con hexano). El factor de EFS que presentó un efecto significativo en la extracción de compuestos carotenoides fue la presión; aunque la temperatura y el % de cosolvente no fueron significativos, sí influenciaron de manera positiva dicha extracción a su nivel intermedio (50 °C y 5% EtOH).

4.1.6 Estudio de correlación de la AA con el CTF y CTC

Aunque la AA encontrada con los extractos del alga *G. mamillaris* no es muy alta (aproximadamente la mitad de inhibición ofrecida por el TBHQ), los valores encontrados del CTF y CTC podrían estar asociados a la AA. Para evaluar esta posible correlación, se realizó un estudio de correlación de Pearson al 95% de confianza, donde R^2 indica el porcentaje de correlación, si R^2 presenta porcentajes entre 0 y 50% el grado de correlación es positivo débil, entre 50 y 80% es positivo moderado, entre 80 y $R^2 < 100\%$ es positivo fuerte y 100% es un grado de correlación positivo perfecto (Hurtado & Domínguez, 2009). Se comparó los tres días de medida de HPL y TBARS de los EFS y los ESPr con los valores de CTF y CTC, como se muestra en la tabla 3-21.

Tabla 4-21. Valores de R^2 mediante correlación lineal (1) EFS (2) ESPr.

	HPL (día 2)	HPL (día 4)	HPL (día 6)	TBARS (día 2)	TBARS (día 4)	TBARS (día 6)
CTF (1)	27.17	26.16	12.90	75.55	77.93	79.65
CTC (1)	0.68	0.50	0.54	21.11	15.65	9.81
CTF (2)	32.47	14.53	24.10	47.23	48.41	55.45
CTC (2)	69.26	82.02	69.76	63.37	63.27	54.19

En los extractos supercríticos (1) se encontró correlación lineal moderada entre el contenido de fenoles y de TBARS; sin embargo, la correlación con los HPL fue débil. Se presentó una correlación muy débil con el CTC.

Los compuestos fenólicos son normalmente reportados como responsables de varias bioactividades, entre ellas la antioxidante, por ser capaces de atrapar radicales libres debido a los grupos hidroxilo (OH) presentes en las moléculas. Varios autores indican el incremento de la AA debido a estos compuestos y proponen a las macroalgas como nuevas fuentes de antioxidantes naturales, debido a su capacidad para captar radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Balamurugan & Selvam, 2013).

En la extracción Soxhlet (2) se observa una correlación moderada del CTC y la concentración de los HPL y las TBARS, indicando para estos extractos que los carotenos

podrían ser parte de los compuestos responsables de la AA, según el ensayo de oxidación acelerada.

Las bajas y moderadas correlaciones entre el CTF y la AA se puede deber a que los mecanismos de acción de las reacciones dadas para la identificación de los compuestos fenólicos y las TBARS son distintos y en el caso de las TBARS muy complejos, además el método empleado para la cuantificación del CTF no es específico, ya que hay otros compuestos que también reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (algunos azúcares reductores) o están presentes otro tipo de componentes que absorben a las mismas longitudes de onda. El método de cuantificación de dienos conjugados (para HPL), el cual se mide a 234 nm, puede presentar interferencias porque algunos productos de descomposición de los hidroperóxidos, como el ácido 9-hidroxi octadeca-10,12-octadienoico y el ácido 13-hidroxi octadeca-9,11-dienoico, que también contribuyen a la absorbancia. En la cuantificación de las TBARS, el TBA puede reaccionar con alcanales, 2-alquenes y 2,4-alcadienes que contribuyen a la absorbancia, también algunas proteínas, productos pardeados de Maillard y productos de degradación de azúcares afectan la medida (Gordon, 2001; Shahidi & Zhong, 2005). Adicionalmente, existen otros compuestos en las algas, que pueden generar actividad antioxidante, tales como las xantofilas, vitaminas E y C y polisacáridos (Batista et al., 2009; Gupta et al., 2011; Schmidt et al., 2012; Stengel et al., 2011).

Del conjunto de resultados relacionados con el alga *G. mamillaris* es de resaltar que el extracto EFS 8 (30 Mpa, 60 °C, 8% EtOH) presentó la inhibición más alta a los TBARS para el día 6 (42.10%) entre todos los extractos estudiados; sin embargo, el extracto S4 (AcOEt) presentó la inhibición más alta a los HPL (24.68%) y el contenido más alto de fenoles (3.92 mg EAG/g alga bs) seguido del extracto EFS 8. El porcentaje de rendimiento fue mayor para los extractos etanólicos Soxhlet S3 y S5, con aproximadamente el doble de rendimiento que el extracto EFS con el rendimiento más alto (8). El contenido de carotenos más alto se encontró para el extracto EFS 10 (30 Mpa, 50 °C, 5% EtOH), con diferencias estadísticas sobre el extracto Soxhlet con mayor CTC (S2 AcOEt previa extracción con hexano). El factor de extracción % de EtOH de los EFS a su mayor nivel (8%), ejerció el efecto principal en la obtención de compuestos que inhibieron los TBARS, en el % de rendimiento y en el CTF; la presión a su mayor nivel (30 MPa) ejerció el principal

efecto en la obtención de compuestos que inhibieron los HPL y en el CTC. Con los extractos EFS se presentó una correlación moderada entre el contenido de fenoles y la inhibición a los TBARS, mientras que con los Soxhlet se presentó una correlación moderada entre el CTC y la inhibición a los HPL y TBARS.

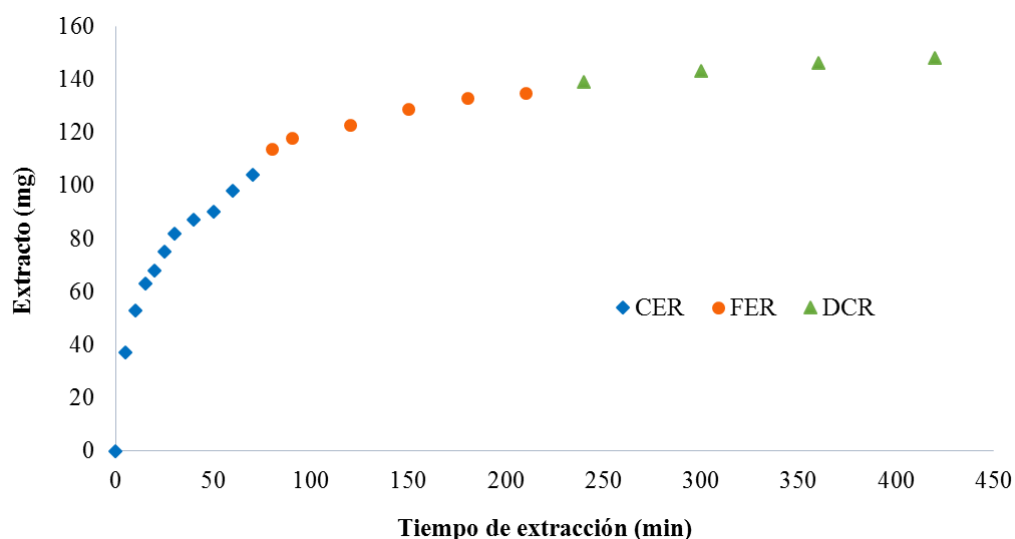
4.2 Resultados para el alga *H. musciformis*

Los resultados obtenidos para el alga *H. musciformis* son presentados de la misma forma a la empleada para el alga *G. mammillaris*.

4.2.1 Curva de extracción con fluidos supercríticos

La extracción del alga *H. musciformis* (figura 3-12), presentó entre los 0-70 min el periodo CER, lo cual representó el 70% (104 mg) del extracto total; el periodo FER se estimó entre 80-210 min con 21% (31 mg) del extracto total y el periodo DCR representó el 9% (13 mg) del extracto total, dado entre los 240-420 min. Se seleccionó 240 min como el tiempo de extracción para el alga *H. musciformis*, correspondiente al 93.92% del extracto total. A 240 min se incluyeron las etapas CER, FER y parte de DCR, debido a que la extracción a los 420 min presentó un rendimiento del 0.70% (148 mg bs).

Figura 4-12. Curva de extracción con el alga *H. musciformis* a 30 MPa, 50°C y 5% EtOH.



4.2.2 Actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante EFS y ESPr

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos se realizó en un aceite vegetal comestible (mezcla de soya y oleína de palma), haciendo el seguimiento a los HPL y TBARS formados durante 6 días (medidos a 0, 2, 4 y 6 días). Los resultados se compararon con el CONTROL (aceite sin adición de antioxidantes), dos antioxidantes sintéticos (BHT y TBHQ) y el antioxidante natural ácido gálico (AG), ver tabla 3-22.

- Actividad antioxidante de extractos EFS

En general todos los extractos y antioxidantes mostraron, en función del tiempo, una reducción en la protección contra la oxidación lipídica del aceite, ya que se observa que las concentraciones de HPL y TBARS aumentaron durante el periodo de observación. Los extractos 8 (30MPa, 60 °C 8%) y 6 (30MPa, 40 °C 8%), presentaron la mayor actividad antioxidante frente a la producción de HPL y 6 y 8 frente a la producción de TBARS.

Para determinar diferencias estadísticas entre los tratamientos se presenta el análisis de RANOVA, ver tablas 3-23 y 3-24. Se observan diferencias significativas de todos los extractos con el control, lo cual indica que todos los tratamientos protegieron al aceite de la oxidación. Es interesante observar que los extractos 6 (30 MPa, 40 °C, 8%), 8 (30 MPa, 60 °C, 8%) y 14 (20 MPa, 50 °C, 8%), no presentan diferencias con el BHT en cuanto a HPL, a pesar de mantener menores valores hasta el cuarto día (tabla 3-22). La protección ante la producción de las especies finales de la oxidación (TBARS), de los extractos 3, 4, 5, 10 y 15 no presenta diferencias significativas con el BHT; de acuerdo a los datos de la tabla 3-22, se observa que durante los 6 días de oxidación dichas protecciones fueron similares. Por otra parte, los extractos 4, 6, 8 y 14 mostraron mayor protección que el BHT durante los seis días. En conclusión los extractos 8 (30 MPa, 60 °C, 8%) y 6 (30 MPa, 40 °C, 8%) del alga *H. musciformis* ofrecieron mayor protección a la oxidación del aceite que el resto de extractos en su etapa inicial, con porcentajes de inhibición a los HPL de 34.68% y 24.42%, respectivamente. Respecto a TBARS, los mayores porcentajes de inhibición correspondieron a los extractos 6 (33.71%) y 8 (31.25%).

Tabla 4-22. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con EFS de *H. musciformis* y antioxidantes sintéticos.

Ext.	HPL (mmol HPL/Kg aceite)			TBARS (mg MDA/Kg aceite)		
	Día 2	Día 4	Día 6	Día 2	Día 4	Día 6
1	14.30±0.44	24.74±1.40	34.15±0.48	1604.33±80.80	2805.69±43.39	3711.06±75.36
2	13.68±0.53	22.81±1.09	32.48±0.18	1635.14±53.28	2698.57±67.65	3471.84±71.22
3	15.78±0.89	25.11±1.40	33.28±0.51	1532.51±74.04	2578.38±54.34	3178.28±90.60
4	13.66±0.55	21.94±0.85	32.03±0.66	1380.75±42.79	2223.13±29.02	3147.43±41.71
5	13.83±0.47	23.51±0.72	34.51±1.03	1523.22±72.76	2548.45±62.96	3294.77±55.06
6	12.86±0.21	20.87±0.21	30.65±1.15	1202.86±86.95	2081.06±70.98	2772.87±9.17
7	13.72±0.32	23.09±1.37	32.05±1.97	1544.74±42.01	2639.79±56.84	3465.12±86.50
8	11.75±1.00	20.47±0.27	26.49±0.39	1088.57±66.84	1923.04±71.22	2895.78±93.17
9	14.05±1.03	23.87±1.08	33.56±0.82	1566.79±57.16	2750.65±49.95	3522.25±40.51
10	13.48±0.73	22.59±0.29	32.76±1.03	1234.92±60.94	2249.94±57.39	3340.25±33.83
11	12.92±0.72	24.36±0.84	32.42±1.07	1597.76±72.97	2673.38±85.00	3343.10±39.95
12	14.61±0.38	22.44±0.21	31.64±1.24	1562.82±48.56	2609.34±55.00	3480.64±9.01
13	12.51±0.81	23.21±0.56	31.65±0.91	1649.76±98.48	2750.42±65.27	3532.55±94.94
14	11.07±0.06	19.40±0.25	31.79±0.20	1158.49±65.17	2070.10±77.00	2932.84±20.83
15	13.92±0.76	24.83±1.52	32.19±1.16	1523.51±134.16	2479.82±125.08	3382.55±127.91
TBHQ	6.86±0.48	10.97±0.54	16.69±0.48	614.83±33.32	1135.17±23.75	2165.82±69.22
BHT	12.64±0.48	20.78±0.65	25.71±0.74	1522.75±39.97	2271.95±66.24	3301.75±69.48
AG	3.16±0.09	6.67±0.27	9.36±0.18	328.86±13.43	704.51±28.53	1065.55±43.71
Control	19.70±0.10	29.74±0.58	40.55±0.46	2177.42±65.10	3438.50±23.94	4181.41±85.45

Resultados expresados como el promedio \pm desviación estándar n=3. HPL en el día cero fue 11.46±0.56 mmol HPL/Kg aceite. TBARS en el día cero fue de 361.51±0.49 mg MDA/Kg aceite.

Tabla 4-23. Diferencias estadísticas de producción de HPL con EFS de *H. musciformis*.

Extractos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TBHQ	AG	BHT
2																		
3																		
4	*		*															
5																		
6	*		*		*													
7																		
8	*	*	*	*	*	*	*											
9							*	*										
10								*										
11								*										
12			*					*										
13	*		*					*										
14	*	*	*		*		*		*	*	*	*						
15						*		*						*				
TBHQ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
AG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
BHT	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*	*		*	*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni

Tabla 4-24. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con EFS de *H. musciformis*.

Extractos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	TBHQ	AG	BHT
2																		
3	*	*																
4	*	*	*															
5	*			*														
6	*	*	*	*	*													
7	*			*		*												
8	*	*	*	*	*		*											
9			*	*	*	*		*										
10	*	*	*		*	*	*	*	*									
11	*			*		*		*		*								
12	*			*		*		*		*								
13			*	*	*	*		*		*								
14	*	*	*	*	*		*		*	*	*	*	*					
15	*	*		*		*		*	*	*			*	*				
TBHQ	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			
AG	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
BHT	*	*				*	*	*	*		*	*	*	*		*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni

Para conocer la influencia de los factores de EFS (presión, temperatura y % de cosolvente) y su comportamiento en la inhibición de la producción de HPL y TBARS en el día 6, se presentan los diagramas de Pareto (figura 3-13) y las superficies de respuesta (figuras 3-14 y 3-15). Las ecuaciones que ajustan los datos a su modelo cuadrático (HPL R^2 : 82.22 y error 2.66; TBARS R^2 : 68.31 y error 3.41), se reportan en el Anexo E, junto con sus coeficientes de regresión y significancias.

La presión ejerció el principal efecto en la obtención de antioxidantes que inhibieron los HPL, seguido de temperatura y del % de EtOH, mientras que el % EtOH y la presión ejercieron un efecto significativo en la obtención de extractos que inhibieron TBARS.

De acuerdo a las superficies de respuesta, los mayores niveles de los tres factores favorecen la obtención de extractos que permiten mayor % de inhibición de HPL. Respecto a TBARS, esto se logra con el aumento de la presión, a bajas temperaturas y altos contenidos de EtOH etanol; puede ser posible que a estas condiciones (donde la densidad

del disolvente es alta), la extracción de compuestos con elevado peso molecular y baja polaridad, como los carotenos, permitiera inhibir o retrasar la descomposición de los hidroperóxidos en TBARS.

Figura 4-13. Efecto estandarizado de los factores de EFS en la AA de *H. musciformis*.

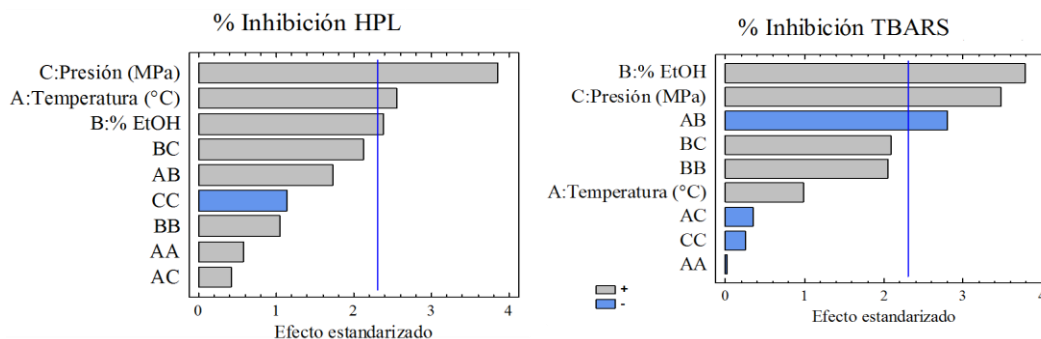


Figura 4-14. Superficies de respuesta para el % de inhibición de HPL versus factores de EFS con *H. musciformis*.

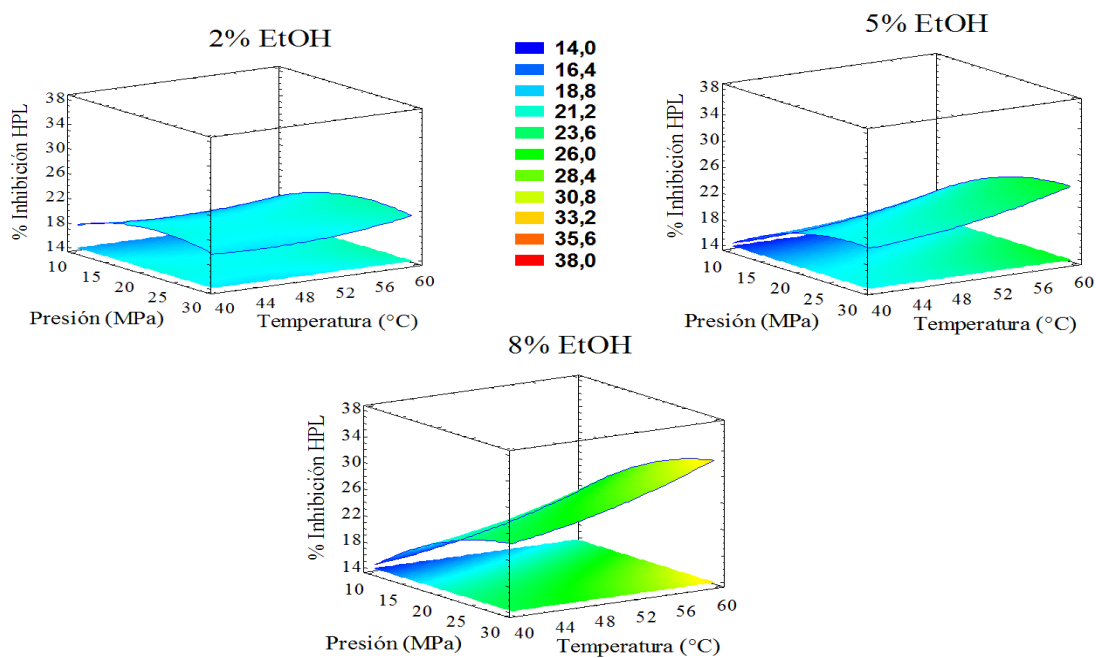
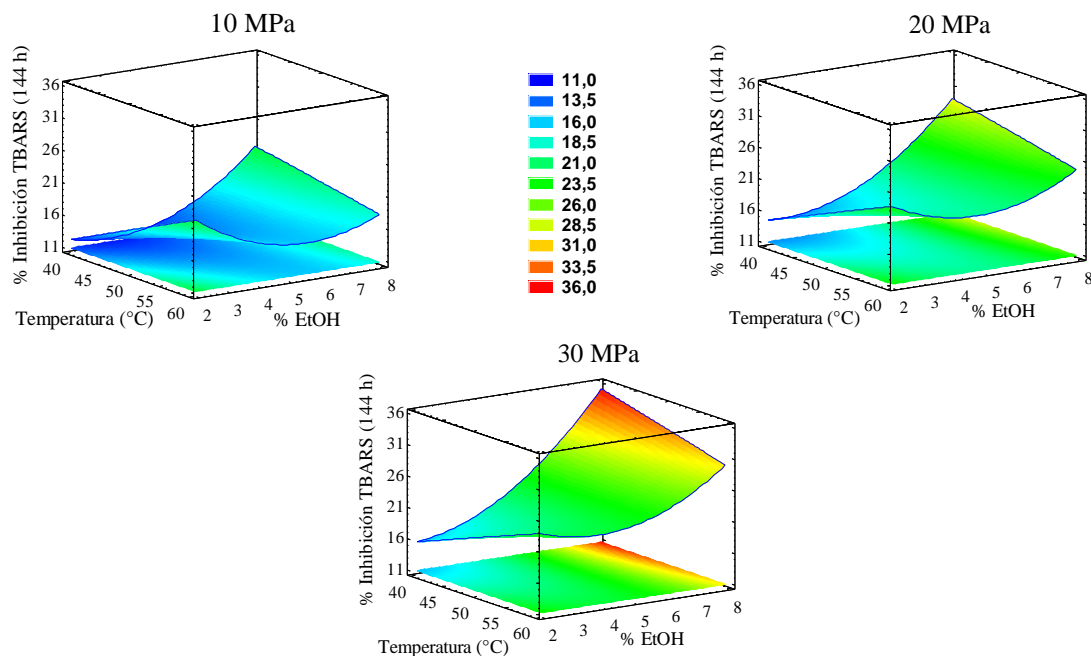


Figura 4-15. Superficies de respuesta para el % de inhibición de TBARS versus factores de EFS con *H. musciformis*.



En la tabla 3-25 se presenta el mejor tratamiento, en la región experimental estudiada, y en la tabla 3-26 se observa el mínimo cambio en los niveles de los factores para lograr un rápido ascenso en el % de inhibición de HPL y TBARS, así como su predicción, según el modelo cuadrático empleado para explicar el comportamiento de los datos.

Tabla 4-25. Niveles de los factores que maximizan el % de inhibición en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo % inhibición HPL	Óptimo % inhibición TBARS
Presión (MPa)	30	30
EtOH (%)	8	8
Temperatura (°C)	60	40
Maximización	32.55	35.52

Tabla 4-26. Trayectoria de máximo ascenso en el % de inhibición con extractos de *H. musciformis*.

Presión (MPa)		EtOH (%)		Temperatura (°C)		Predicción	
(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
20.00	20.00	5.00	5	50	50.00	20.34	18.00
21.33	22.39	5.30	6	51	50.30	21.24	21.69
22.39	24.10	5.64	7	52	50.03	22.18	25.53
23.28	25.54	6.01	8	53	49.52	23.24	30.54
24.07	26.82	6.40	9	54	48.86	24.43	36.78
24.78	28.00	6.81	10	55	48.12	25.77	44.29

(1) HPL (2) TBARS

De acuerdo al análisis estadístico, los niveles más altos de los tres factores de extracción EFS favorecen la obtención de extractos que retrasan, detienen o inhiben la producción de HPL; para TBARS este efecto de inhibición es más significativo cuando la temperatura es menor y los niveles de presión y % de EtOH son los más altos (30 MPa y 8%). Esto corrobora el análisis realizado a partir de la tabla 3-21 donde se concluyó que los extractos con mayor AA del alga *H. musciformis* fueron el extracto 6 (30 MPa, 40 °C, 8%) y el 8 (30 MPa, 60 °C, 8%).

- Actividad antioxidante de extractos Soxhlet a presión reducida

Los extractos ESPr corresponden a: **S1** extracto obtenido con hexano; **S2** extracto con AcOEt previa extracción con hexano; **S3** extracto con EtOH previa extracción con hexano y AcOEt; **S4** extracto obtenido con AcOEt; **S5** extracto con EtOH previa extracción con AcOEt; **S6** extracto obtenido con EtOH. En la tabla 3-27 se observan los resultados obtenidos para HPL y TBARS, y en las tablas 3-28 y 3-29 el análisis de RANOVA.

En la tabla 3-27 se observan los resultados obtenidos en la medida de los HPL y TBARS para el alga *H. musciformis*. Las medidas de la concentración de HPL y TBARS fueron ascendentes durante los 6 días de oxidación. Además, todos los extractos fueron significativamente diferentes al control, tanto en HPL como en TBARS, lo cual indica que protegieron en alguna medida el aceite en sus etapas inicial y final de oxidación. Sin

embargo todos los extractos también mostraron diferencias con los antioxidantes TBHQ y AG, indicando que no superaron la protección lipídica ofrecida por estos dos antioxidantes. Con los extractos de mediana y alta polaridad el porcentaje de inhibición de HPL se ubicó alrededor de un 20% y con TBARS en un 30%. El extracto S6 (EtOH) presentó la mayor inhibición en el día 6 a la oxidación lipídica, HPL (23.98%) y TBARS (28.55%), seguido del extracto con AcOEt (S4).

Tabla 4-27. Contenido de HPL y TBARS obtenidos durante la oxidación acelerada de aceite, con extractos Soxhlet del alga *H. musciformis* y antioxidantes sintéticos.

Extracto	HPL (mmol HPL/Kg aceite)			TBARS (mg MDA/Kg aceite)		
	Día 2	Día 4	Día 6	Día 2	Día 4	Día 6
S1	8.76±0.19	23.43±0.98	28.82±0.58	1023.71±35.41	1315.81±8.15	1626.39±41.39
S2	8.10±0.19	22.16±0.34	27.51±0.42	928.70±36.66	1277.73±20.05	1531.33±45.64
S3	7.41±0.46	20.58±0.82	25.71±0.16	882.66±40.53	1170.31±51.47	1478.70±52.14
S4	7.27±0.14	19.81±0.14	24.58±0.43	821.49±29.02	1108.69±33.13	1398.51±50.39
S5	8.42±0.31	23.00±0.73	27.70±0.61	956.16±34.01	1321.01±37.59	1602.57±8.73
S6	6.85±0.23	19.67±0.25	24.11±0.58	844.14±9.39	1179.42±14.29	1348.03±51.04
TBHQ	3.60±0.08	11.45±0.25	18.41±0.30	432.49±13.52	655.17±28.89	967.25±43.37
AG	1.86±0.10	7.10±0.29	11.35±0.56	226.64±12.66	390.72±18.26	676.91±29.88
Control	10.48±0.57	26.93±0.99	31.71±0.17	1280.17±52.33	1626.93±79.44	1886.69±60.03

Los valores son expresados como el promedio \pm la desviación estándar (n=3). HPL en el día cero fue 6.08 ± 0.53 mmol HPL/Kg aceite. TBARS en el día cero fue 282.33 ± 0.39 mg MDA/Kg aceite

Las diferencias estadísticas de los resultados de la concentración de HPL y TBARS, fueron obtenidas a partir del RANOVA. Los resultados son presentados en las tablas 3-28 y 3-29.

Tabla 4-28. Diferencias estadísticas de producción de HPL con extractos Soxhlet de *H. musciformis*.

Extractos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	TBHQ	AG
S2	*							
S3	*	*						
S4	*	*						
S5			*	*				
S6	*	*	*		*			
TBHQ	*	*	*	*	*	*		
AG	*	*	*	*	*	*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni

Tabla 4-29. Diferencias estadísticas de producción de TBARS con extractos Soxhlet de *H. musciformis*.

Extractos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	TBHQ	AG
S2	*							
S3	*	*						
S4	*	*	*					
S5			*	*				
S6	*	*			*			
TBHQ	*	*	*	*	*	*		
AG	*	*	*	*	*	*	*	
Control	*	*	*	*	*	*	*	*

* Indica diferencia estadísticas ($p < 0.05$), según la prueba de Bonferroni.

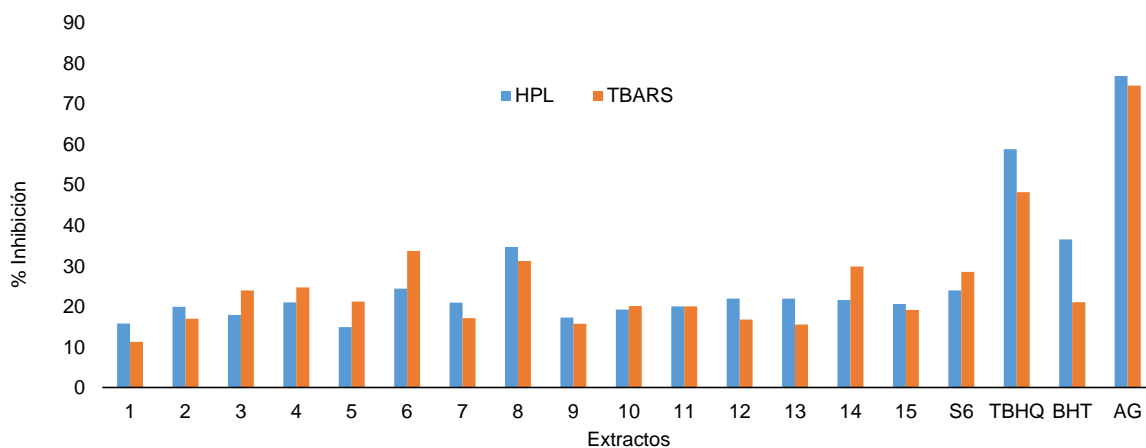
- Comparación de la AA ofrecida por los EFS y los ESPr

Para comparar la AA de los extractos EFS con el extracto Soxhlet de mayor AA (Etanol S6), en la figura 3-16 se presentan los resultados del porcentaje de inhibición de HPL y TBARS únicamente para el día 6 de oxidación con los extractos del alga *H. musciformis*.

El extracto S6 presentó un valor de inhibición de HPL (23.98%) inferior al BHT (36.59%), al extracto 8 (34.68%) y al extracto 6 (24.42%). En cuanto a TBARS, la inhibición de S6 (28.55%) fue mayor a la presentada por el BHT (21.06%), pero menor a la del extracto 6

(33.71%), 8 (31.25%) y 14 (29.88%). En conclusión, sólo los extractos 6 (30 MPa, 40 °C, 8%) y 8 (30 MPa, 60 °C, 8%) obtenidos por EFS ejercieron mayor protección sobre el aceite que el extracto S6, lo que indica que la EFS fue más selectiva frente a la extracción de compuestos con mayor AA que la extracción Soxhlet.

Figura 4-16. Porcentaje de inhibición de HPL y TBARS con extractos de *H. musciformis*.



Comparando con otros estudios, el extracto metanólico del alga *G. filicina* adicionado a aceite refinado de pescado (almacenado a 65 °C por 7 días) logró inhibir las TBARS en 40%, superando al BHT (Athukorala et al., 2005). Aunque en la presente investigación se empleó mezcla de aceites menos susceptibles a la oxidación, la oxidación se hizo a condiciones más agresivas (adición de ion ferroso y 70 °C), esto puede explicar por qué el extracto EFS 6 inhibió en un 33.71% la formación de TBARS en el aceite. En otro estudio de oxidación acelerada 65 °C (Wanasundara & Shahidi, 1998), inhibieron la formación de TBARS en 18.62% en aceite de foca y 6.34% en aceite de pescado (arenque) a los 6 días, con 200 ppm de un extracto etanólico de té verde sin clorofila.

4.2.3 Rendimiento de extracción

En la tabla 3-30 se presentan los porcentajes de rendimiento en base seca (bs) para los extractos supercríticos seguidos de los extractos Soxhlet.

De acuerdo a las dos técnicas extractivas, los disolventes de mayor polaridad, permitieron mayores rendimientos de extracción, sugiriendo que una cantidad importante de

compuestos presentan polaridad intermedia. Para los EFS se observa que el mayor % de rendimiento fue para los extractos 6 (30 MPa, 40 °C, 8% EtOH) y 8 (30 MPa, 60 °C, 8% EtOH). En los ESPr el mayor rendimiento fue para el extracto obtenido con EtOH (S6) seguido del obtenido con EtOH previa extracción con hexano y AcOEt (S3).

El extracto EFS 6 (1.24%) presentó aproximadamente la mitad del rendimiento que el extracto S6 (2.40%). La misma técnica tradicional con acetato de etilo (S4) presentó un rendimiento de 1.01%, valor que se encuentra dentro del rango de rendimientos de la EFS realizada a los mayores porcentajes de EtOH. El rendimiento de la técnica soxhlet con hexano (S1, 0.29%), es comparable a los rendimientos obtenidos en EFS cuando se emplearon los menores niveles de presión y de %EtOH.

Comparando los resultados de porcentaje de rendimiento de los extractos ESPr con otros estudios, de acuerdo la tabla 3-31, se observa que el valor para el extracto S6, presenta un rendimiento similar al emplear un disolvente menos polar (diclorometano), mientras que comparado con metanol, se obtuvo solo la mitad del rendimiento reportado en la literatura (Chakraborty et al., 2013; Guedes et al., 2013).

Tabla 4-30. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *H. musciformis* obtenidos mediante EFS y Soxhlet.

Extracto	Factores			% Rendimiento
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	0.22
2	30	40	2	0.35
3	10	60	2	0.23
4	30	60	2	0.60
5	10	40	8	0.98
6	30	40	8	1.24
7	10	60	8	1.06
8	30	60	8	1.13
9	10	50	5	0.11
10	30	50	5	0.93
11	20	40	5	0.63
12	20	60	5	0.68
13	20	50	2	0.74
14	20	50	8	0.82
15.1	20	50	5	0.54
15.2	20	50	5	0.52
15.3	20	50	5	0.50
15.4	20	50	5	0.68
S1				0.29 ± 0.01 a
S2				0.56 ± 0.03 b
S3				1.93 ± 0.06 c
S4				1.01 ± 0.05 d
S5				1.91 ± 0.08 c
S6				2.40 ± 0.09 e

Valores son expresados como el promedio ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey

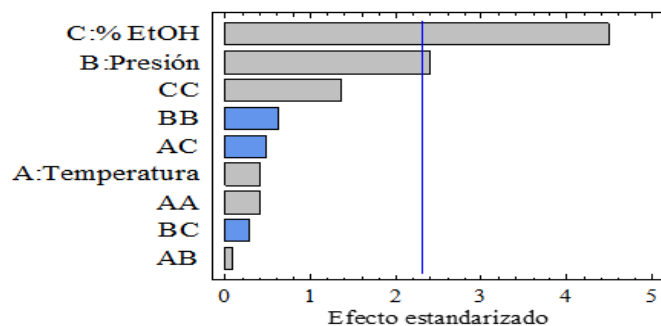
Tabla 4-31. Porcentajes de rendimiento reportados en la literatura con técnicas de extracción convencionales.

Disolvente	Método de extracción	% p/p Rendimiento (bs)	Macroalga	Referencia
Diclorometano	Maceración	2.58	<i>H. musciformis</i>	(Guedes et al., 2013)
Diclorometano	Maceración	3.04	<i>P. gymnospora</i>	
Metanol	Maceración	4.83	<i>H. musciformis</i>	(Chakraborty et al., 2013)

Con los datos de porcentaje de rendimiento obtenidos para los extractos EFS, se determinó la influencia que ejercieron en esta variable los factores de extracción (presión, temperatura y % de cosolvente) y sus niveles en dicha variable respuesta. Para ello los datos se ajustaron a un modelo cuadrático. Con la ecuación que describe su comportamiento se caracteriza la superficie de respuesta, se conocen los coeficientes de regresión de los factores, su interacción y su doble interacción, cuyos p-valor indican la influencia de las contribuciones de los coeficientes de regresión al modelo (Anexo F). El modelo estadístico ajusta los datos experimentales con R^2 : 54.44% y un error debido a la variabilidad de los resultados de 0.22.

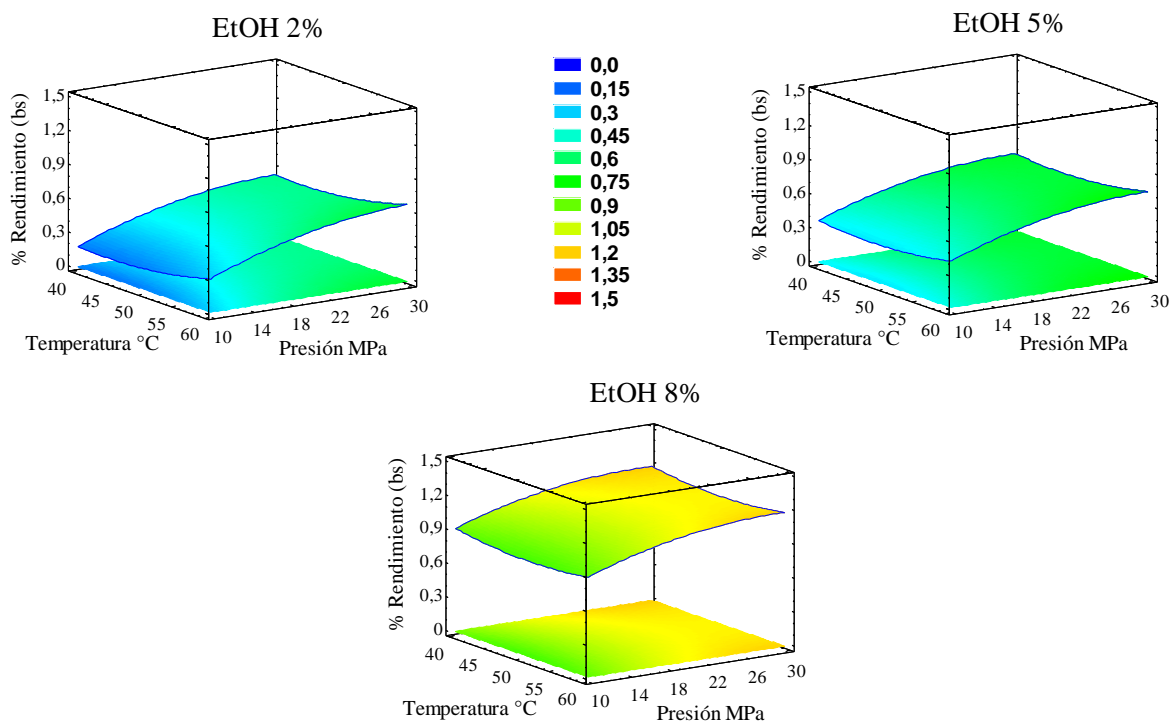
La influencia de los factores se puede observar en la figura 3-17, con el diagrama de Pareto. Las barras grises indican un efecto principal de incremento y las barras azules de descenso en el % de rendimiento, de los tres factores y sus interacciones. Se observa que el porcentaje de EtOH (C), ejerció el mayor efecto principal de incremento sobre el rendimiento, seguido de la presión (B), mientras que la temperatura no presentó un efecto significativo sobre el porcentaje de rendimiento.

Figura 4-17. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el % p/p de rendimiento (bs) de *H. musciformis*.



La interacción temperatura-presión se tuvo en cuenta para construir las superficies de respuesta a los distintos niveles de cosolvente, ya que este último presentó el efecto más significativo en el rendimiento (figura 3-18). En general se observa en las superficies de respuesta, que el porcentaje de rendimiento aumenta con el incremento del porcentaje de cosolvente y en menor medida con el aumento de la presión. La presión presenta una baja influencia en el modelo, no obstante entre los 18 y 30 MPa, aproximadamente, influencia ascendente al porcentaje de rendimiento, cuando el nivel de EtOH también es el más alto (8%). Al menor nivel de EtOH y 30 MPa, el incremento en la temperatura aumentó el rendimiento, debido al aumento en la presión de vapor de los solutos.

Figura 4-18. Superficies de respuesta del % de rendimiento versus factores de EFS con *H. musciformis*.



De acuerdo al análisis estadístico se encontró el mejor tratamiento en la región experimental estudiada (tabla 3-32) y el trayecto por el cual el % de rendimiento asciende rápidamente, con el menor cambio posible en los factores experimentales (tabla 3-33).

Tabla 4-32. Niveles de los factores de EFS que maximizan el porcentaje de rendimiento en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	28.4
EtOH (%)	8
Temperatura (°C)	40
Valor óptimo % Rendimiento	1.19

Tabla 4-33. Trayectoria de máximo ascenso en el rendimiento de EFS de *H. musciformis*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción rendimiento (%p/p (bs))
20.0	5	50.0	0.58
21.4	6	50.2	0.72
22.2	7	50.3	0.90
22.8	8	50.3	1.10
23.2	9	50.3	1.34
23.5	10	50.2	1.63

Se concluye que con la extracción Soxhlet con etanol se obtuvieron rendimientos más altos que con la EFS, siendo S6 (EtOH) el extracto con la mayor capacidad de solubilizar compuestos en el alga. En la EFS los factores más significativos en el rendimiento fueron el % de cosolvente, seguido de la presión, ambos a sus mayores niveles.

4.2.4 Contenido total de fenoles

En la tabla 3-34 se muestran los resultados de la determinación de CTF de los extractos EFS (1-15) y Soxhlet (S1-S6) del alga *H. musciformis*. Con relación a los EFS, el mayor CTF corresponde los extractos 8 y 10, los cuales no presentan diferencias estadísticas. De acuerdo a los valores obtenidos para los ESPr, el CTF más alto correspondió al extracto S6, seguido del extracto S4 con diferencias significativas entre ambos. No hay diferencia estadística entre los extractos 8 y 10 con respecto al extracto S6, indicando que estos extractos tuvieron la misma capacidad de solubilizar compuestos fenólicos (así como otros compuestos que dan positivo en la prueba de Folin-Ciocalteu).

Tabla 4-34. CTF de los extractos de *H. musciformis* obtenidos mediante EFS y Soxhlet.

Extracto	Factores			mg EAG/g alga (bs) <i>H. musciformis</i>
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	0.805 ± 0.007 a
2	30	40	2	1.460 ± 0.011 b
3	10	60	2	0.754 ± 0.006 a
4	30	60	2	2.324 ± 0.020 cd
5	10	40	8	3.293 ± 0.030 e
6	30	40	8	3.461 ± 0.031 f
7	10	60	8	3.213 ± 0.025 e
8	30	60	8	3.858 ± 0.036 g
9	10	50	5	0.533 ± 0.005 h
10	30	50	5	3.805 ± 0.033 g
11	20	40	5	2.591 ± 0.023 i
12	20	60	5	2.399 ± 0.020 d
13	20	50	2	2.293 ± 0.019 c
14	20	50	8	2.747 ± 0.029 j
15	20	50	5	2.357 ± 0.019 cd
S1				0.227 ± 0.009 k
S2				2.685 ± 0.044 ij
S3				1.786 ± 0.039 l
S4				3.636 ± 0.068 m
S5				1.442 ± 0.052 b
S6				3.756 ± 0.064 g

Valores son expresados como el promedio ± la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey

El CTF encontrado con los extractos EFS, superan en su mayoría el valor que Sivagnanam et al. (2015) reportan con el extracto EFS CO₂-etanol del alga *Sargassum horneri*, (0.64 ± 0.01 mg EAG/ g de alga (bs)) y con el extracto del alga *Saccharina japónica* (CO₂-etanol, 25 MPa, 45 °C) (0.60 ± 0.05 mg EAG/ g de alga (bs)).

Comparando los valores de CTF obtenidos con los extractos Soxhlet y los valores obtenidos en otros estudios mediante técnicas convencionales (tabla 3-35), se obtuvo mayor CTF cuando se comparan los extractos de mediana y alta polaridad (S2, S3, S4, S5 y S6), con otros estudios donde emplearon etanol o metanol en la extracción, a excepción de las extracciones por maceración. Cabe resaltar que los extractos S2 y S4, obtenidos

con AcOEt (de mediana polaridad), presentan un CTF superior a extractos de alta polaridad reportados en la literatura.

Tabla 4-35. CTF reportado en la literatura para *H. musciformis*.

Disolvente	CTF mg EAG/ g (bs)	Macroalga	Referencia
Metanol	0.61±0.04	<i>H. musciformis</i>	(Balamurugan & Selvam, 2013)
Metanol (maceración 50-60 °C 3 h)	6.91	<i>H. musciformis</i>	(Chakraborty et al., 2013)
Cloroformo: metanol 2:1 (soxhlet 24 h)	0.58 ± 0.03	<i>H. musciformis</i>	(Yildiz et al., 2011)
Etanol (Soxhlet 6 h)	1.04 ± 0.03	<i>H. musciformis</i>	(Parthiban & Saranya, 2013)
Etanol	0.21 ± 0.04	<i>H. musciformis</i>	(Sarojini et al., 2016)

Para determinar el efecto de los factores de EFS en el CTF se presenta el diagrama de Pareto (figura 3-19), donde se observa que el porcentaje de etanol (B), ejerció un efecto significativo en el CTF, seguido de la presión (A). Adicionalmente, en las superficies de respuesta (figura 3-20) se observa un aumento del CTF cuando el nivel de % EtOH, presión y temperatura son los más altos. Este comportamiento se puede atribuir a que el mayor nivel en cosolvente aumentó la polaridad de la fase disolvente (CO₂/EtOH), lo cual pudo atraer mayor cantidad de compuestos fenólicos. Además, el fenómeno de retrogradación influye en esta respuesta, ya que a altas presiones y temperaturas, la solubilidad de los compuestos en el disolvente se debe principalmente a la presión de vapor de los solutos. Los resultados del CTF se ajustaron a un modelo cuadrático (R²: 77.23%, error: 0.68), cuya ecuación, coeficientes y contribuciones (p-valor) se encuentran en el Anexo G.

Figura 4-19. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTF de *H. musciformis*

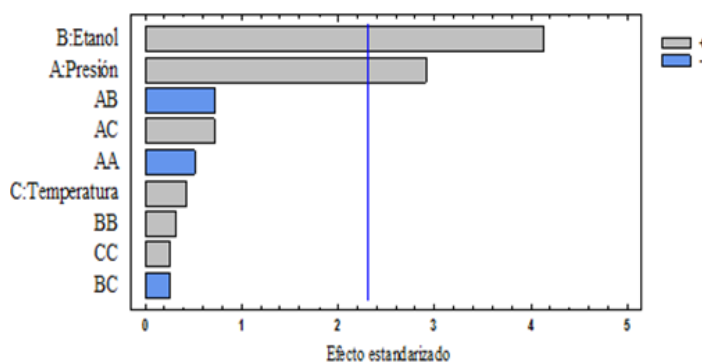
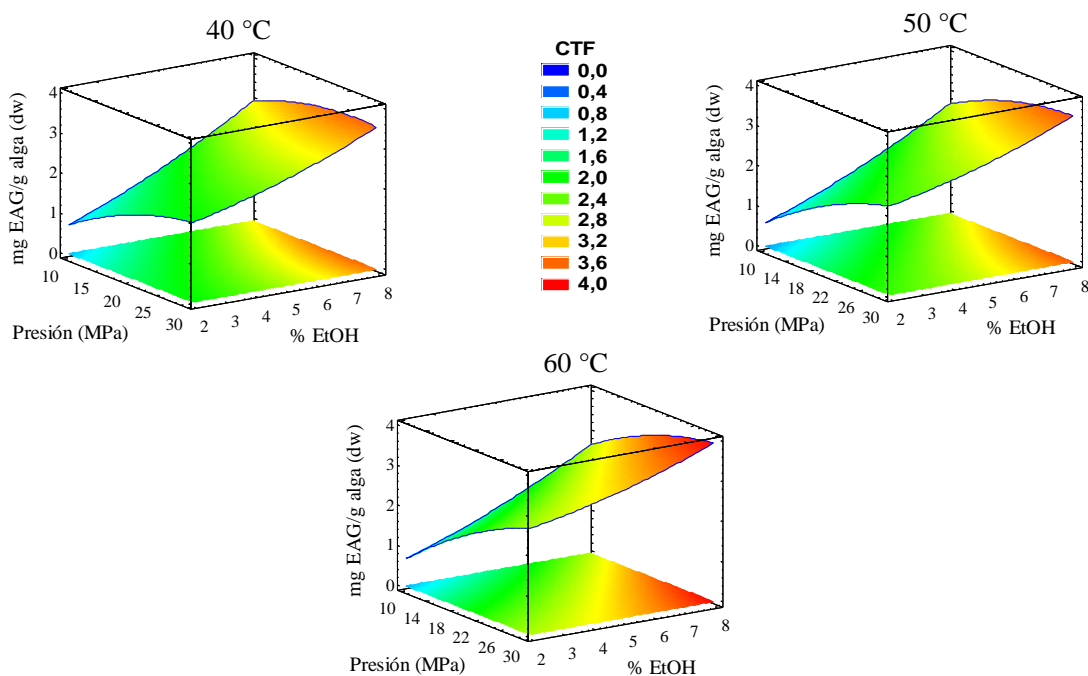


Figura 4-20. Superficies de respuesta del CTF versus factores de EFS con *H. musciformis*



En la tabla 3-36 se presenta el mejor tratamiento de la región experimental estudiada y el valor de CTF que se alcanzaría con los niveles de los factores propuestos. El mínimo cambio en los niveles de los factores, para lograr un rápido ascenso en el CTF, así como su predicción, se observa en la tabla 3-37, de acuerdo al modelo empleado para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Tabla 4-36. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTF en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	30
EtOH (%)	8
Temperatura (°C)	60
Valor óptimo CTF	3.95

Tabla 4-37. Trayectoria de máximo ascenso en el CTF de extractos EFS de *H. musciformis*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción CTF
20	5.00	50.00	2.37
21	5.45	50.17	2.57
22	5.98	50.38	2.79
23	6.62	50.65	3.04
24	7.42	51.00	3.35
25	8.57	51,49	3.80

En conclusión, el CTF más alto de acuerdo con los datos de las dos técnicas extractivas, fue para los extractos 8 (30 MPa, 60 °C, 8% EtOH) y 10 (30 MPa, 50 °C, 5% EtOH) obtenidos por EFS, seguidos del extracto Soxhlet S6 (EtOH), los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En los EFS las variables que influenciaron significativamente la extracción de compuestos fenólicos fueron la presión seguida del % de cosolvente al máximo nivel (30 MPa y 8% EtOH).

4.2.5 Contenido total de carotenos

En la tabla 3-38 se presenta el CTC de los extractos obtenidos por EFS y ESPr para la macroalga *H. musciformis*, y se comparan a través de ANOVA. El mayor contenido en carotenos corresponde a los extractos supercríticos; el extracto 11 y el 10 presentaron los valores más altos, sin diferencias significativas entre ellos, seguidos de otros extractos EFS donde el nivel de presión fue el más alto. Entre los ESPr, S4 presentó el CTC más alto; sin embargo, fue casi la mitad del valor de CTC obtenidos con los extractos EFS.

Tabla 4-38. CTC de los extractos de *H. musciformis* obtenidos mediante EFS y Soxhlet

Extracto	Factores			mg β C/g alga (bs)
	Presión (MPa)	Temperatura (°C)	EtOH %	
1	10	40	2	3.460 \pm 0.058 a
2	30	40	2	4.404 \pm 0.075 b
3	10	60	2	0.534 \pm 0.014 c
4	30	60	2	4.622 \pm 0.059 d
5	10	40	8	4.257 \pm 0.077 b
6	30	40	8	4.021 \pm 0.074 e
7	10	60	8	3.010 \pm 0.068 f
8	30	60	8	3.953 \pm 0.066 e
9	10	50	5	2.359 \pm 0.082 g
10	30	50	5	5.508 \pm 0.062 h
11	20	40	5	5.643 \pm 0.070 h
12	20	60	5	4.312 \pm 0.071 b
13	20	50	2	4.606 \pm 0.075 d
14	20	50	8	3.429 \pm 0.053 a
15	20	50	5	3.183 \pm 0.056 f
S1				0.596 \pm 0.024 c
S2				1.841 \pm 0.070 i
S3				0.330 \pm 0.014 j
S4				2.633 \pm 0.061 k
S5				0.306 \pm 0.014 j
S6				1.850 \pm 0.047 i

Valores son expresados como el promedio \pm la desviación estándar (n=3). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según la prueba de Tukey

Comparando los resultados obtenidos con otros estudios Thinakaran & Sivakumar, (2012) obtuvieron con el alga *H. musciformis* 0.27 mg C/g muestra (bs), mediante una técnica de extracción tradicional con acetona, lo cual muestra que los resultados obtenidos en el presente estudio fueron más altos con ambas técnicas extractivas.

Para conocer la influencia de los factores de EFS (presión, temperatura y % de cosolvente) y sus niveles, sobre el CTC de los extractos EFS de *H. musciformis*, a continuación se presenta el diagrama de Pareto (figura 3-21) donde se observa que únicamente la presión ejerció un efecto significativo en el CTC. En las superficies de respuesta (figura 3-22) el CTC se incrementa cuando el nivel de presión es el más alto y el de cosolvente el más

bajo. Con el nivel más bajo en temperatura, a la mayor presión (40°C y 30 MPa) se hace más denso el disolvente y menos polar, ya que el etanol también se encuentra a su menor nivel, lo cual puede hacer más solubles los carotenos, ya que son de baja polaridad y alto peso molecular. La ecuación que ajusta los datos a su modelo cuadrático (R^2 : 72.81% y error 0.89) se reporta en el Anexo H junto con sus coeficientes de regresión y significancia.

Figura 4-21. Efecto estandarizado de los factores de EFS en el CTC de *H. musciformis*.

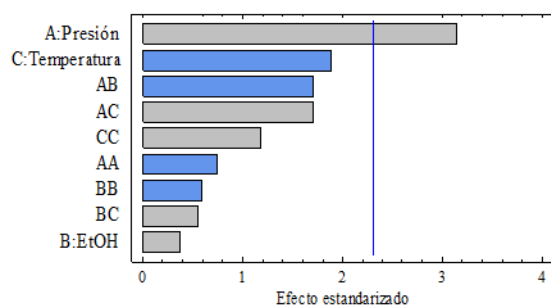
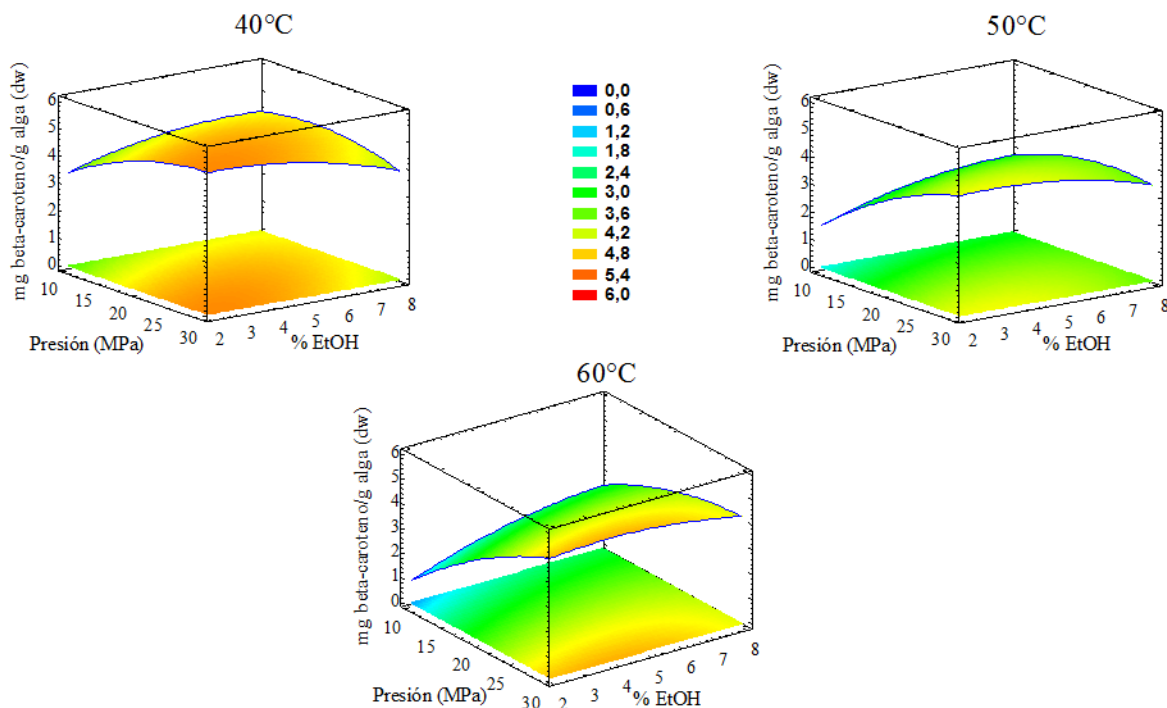


Figura 4-22. Superficies de respuesta del CTC versus factores de EFS con *H. musciformis*.



En la tabla 3-39 se presenta el mejor tratamiento de la región experimental estudiada y el valor de CTC que se alcanzaría con los niveles de los factores propuestos. En la tabla 3-40 se observa el mínimo cambio en los niveles de los factores, para lograr un rápido ascenso en el CTC, así como su predicción, según el modelo empleado para explicar el comportamiento de los datos obtenidos.

Tabla 4-39. Niveles de los factores de EFS que maximizan el CTC en la región experimental estudiada.

Factor	Óptimo
Presión (MPa)	30.00
EtOH (%)	2.13
Temperatura (°C)	40.00
Valor óptimo CTC	5.17

Tabla 4-40. Trayectoria de máximo ascenso en el CTC de EFS de *H. musciformis*.

Presión (MPa)	EtOH (%)	Temperatura (°C)	Predicción CTC
20	5.00	50.00	3.76
21	5.02	49.34	3.88
22	5.02	48.50	3.99
23	4.99	47.45	4.13
24	4.99	45.44	4.34
25	4.45	36.97	5.60

En conclusión, con los extractos supercríticos 11 y 10 se obtuvo el mayor CTC. En los extractos Soxhlet, el CTC más alto fue para S4 (AcOEt). El factor de EFS que presentó un efecto significativo en la extracción de compuestos carotenoides fue la presión, aunque la temperatura no fue significativa, se observó en las superficies de respuesta que sí influyó de manera positiva dicha extracción a su nivel más bajo (40 °C).

4.2.6 Estudio de correlación de la AA con el CTF y CTC

Aunque la AA encontrada con los extractos del alga *H. musciformis* no es muy alta (aproximadamente la mitad de inhibición ofrecida por el TBHQ), los valores encontrados del CTF y CTC podrían estar asociados a la AA. Para evaluar esta posible correlación, se realizó un estudio de correlación de Pearson al 95% de confianza, donde R^2 indica el porcentaje de correlación. Se comparó los tres días de medida de HPL y TBARS de los EFS y los ESPr con los valores de CTF y CTC, como se muestra en la tabla 3-41.

Tabla 4-41. Valores de R^2 mediante correlación lineal para EFS (1) y para ESPr (2).

	HPL (día 2)	HPL (día 4)	HPL (día 6)	TBARS (día 2)	TBARS (día 4)	TBARS (día 6)
CTF (1)	25.99	26.62	23.57	35.60	41.88	26.62
CTC (1)	17.14	7.07	2.24	1.33	2.17	0.04
CTF (2)	65.12	64.35	69.71	71.39	43.40	71.27
CTC (2)	26.88	32.85	32.51	38.03	31.88	42.34

En los extractos supercríticos (1) no se observa correlación lineal baja entre el CTF y CTC con los HPL y TBARS. Con los extractos Soxhlet (2) se observa una correlación moderada entre el CTF con la AA, indicando para estos extractos que los fenoles presentes en los extractos del alga *H. musciformis* podrían ser parte de los compuestos responsables de la AA, de acuerdo a los resultados del ensayo de oxidación acelerada.

Del conjunto de resultados relacionados con el alga *G. mammillaris* es de resaltar que el extracto supercrítico 6 presentó la inhibición más alta (33.71%) frente a las TBARS, seguido del extracto supercrítico 8, los cuales superaron al BHT; sin embargo, ambos extractos fueron superados en la inhibición a los HPL por el BHT. El rendimiento más alto fue para el extracto Soxhlet S6 (obtenido con etanol), seguido de los extractos supercríticos 6 y 8. El CTF y CTC fue más alto para los extractos EFS; el extracto supercrítico 8 presentó el contenido total de fenoles más alto, seguido del extracto 6 y con los carotenos, el extracto supercrítico 11 presentó el contenido más alto, seguido del 10. La presión a su nivel más alto (30 MPa), ejerció un efecto significativo en la inhibición de HPL y el CTC, mientras que el % de etanol a su mayor nivel (8%), ejerció un efecto significativo en la inhibición de TBARS, el rendimiento y el CTF.

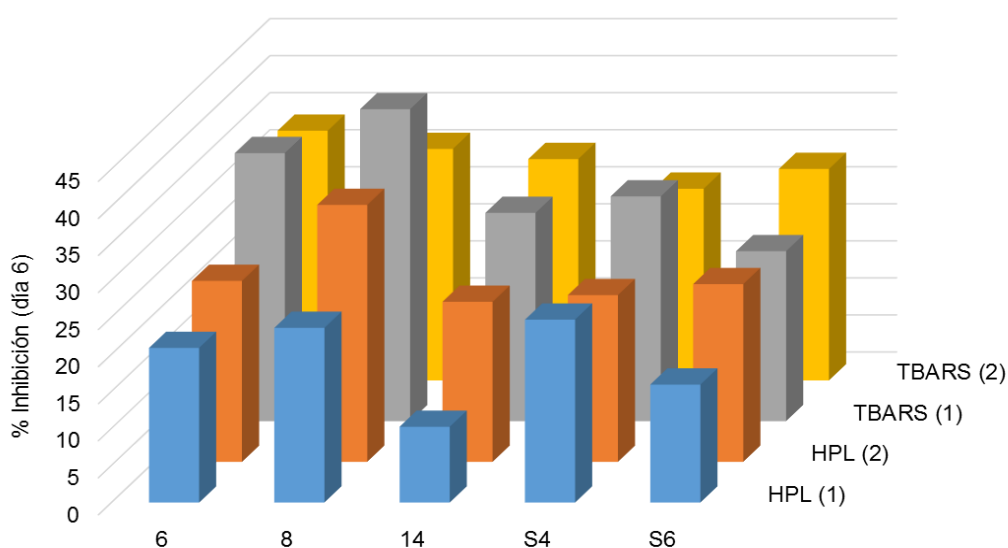
4.3 Comparación de los resultados obtenidos entre los extractos de las dos algas

En la figura 3-23 se comparan los extractos EFS y ESPr de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris* con los mayores porcentajes de inhibición a la oxidación lipídica en el aceite empleado para el día 6 de oxidación, tanto en su etapa inicial (HPL), como en tu etapa final (TBARS).

Se observa que la protección del extracto 8 (30 MPa, 60 °C, 8 % EtOH) de *H. musciformis*, en la etapa inicial de la oxidación, estuvo por encima de los demás extractos, mientras que el mismo extracto en el alga *G. mammillaris* presentó la mayor protección frente a algunas

especies de oxidación secundarias y finales (TBARS). La inhibición de los HPL fue mayor con extractos de *H. musciformis* para los extractos comparados; aunque con los extractos de *G. mammillaris* los porcentajes de inhibición de HPL fueron los más bajos, la inhibición ofrecida a los TBARS fue la más alta (extractos 8 y 6), lo cual puede ocurrir si los antioxidantes presentes en dichos extractos, interrumpen los pasos de propagación de la oxidación lipídica, donde los hidroperóxidos se descomponen, por ejemplo antioxidantes primarios como los compuestos fenólicos. Pero también puede ser atribuido a antioxidantes de tipo secundario, ya que éstos pueden descomponer los hidroperóxidos a especies no radicalarias.

Figura 4-23. Comparación de los % de inhibición de HPL y TBARS ofrecidos por extractos de las algas (1) *G. mammillaris* (2) *H. musciformis*.



Respecto a dichos extractos, cabe destacar que el rendimiento fue mayor para el extracto S6 (EtOH) del alga *G. mammillaris* (figura 3-24), sin embargo no fue el extracto con mayor AA. De acuerdo a la misma grafica el extracto supercrítico 8 de la misma alga presentó un rendimiento superior al resto de extractos (a excepción de S6), pero además la mayor inhibición a la producción de TBARS, y un CTF estadísticamente comparable con el extracto S4 que presento el CTF más alto (figura 3-25). En el CTC (figura 3-26) no se presentan diferencias estadísticas entre los extractos 6 y 8 de *H. musciformis* y el extracto

S4 de *G. mammillaris*, los cuales son los más altos. De acuerdo a estas comparaciones, el extracto 8 obtenido mediante EFS, se presentó como el más promisorio frente a los demás extractos empleados en los análisis realizados en la presente investigación.

Figura 4-24. Comparación del porcentaje de rendimiento de algunos extractos de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*.

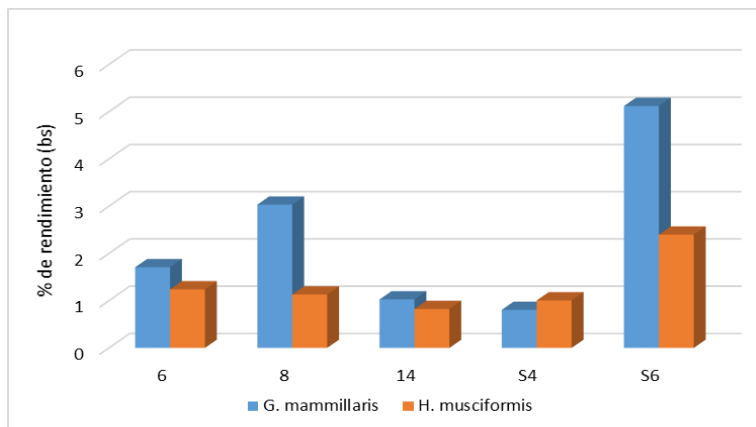


Figura 4-25. Comparación del CTF de algunos extractos de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*.

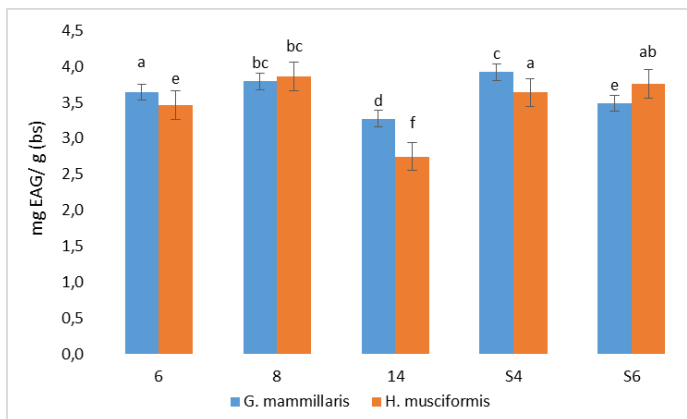
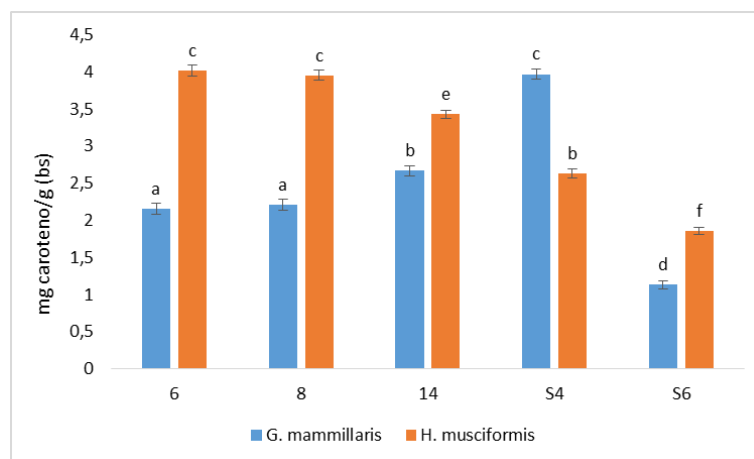


Figura 4-26. Comparación del CTC de algunos extractos de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*.



Teniendo en cuenta que los extractos de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris* correspondieron a la mezcla de varios compuestos afines al disolvente empleado, es decir extractos crudos (no eran moléculas puras tales como el TBHQ o el BHT), y que la concentración empleada en el aceite para protegerlo fue baja (200 ppm), dichos extractos se presentan como fuente promisorio de compuestos con AA. Estos resultados se presentan como un aliciente para dar valor agregado al recurso ficológico del país.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Los extractos procedentes de las algas *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux y *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe, obtenidos mediante extracción Soxhlet y EFS, retardaron la oxidación del aceite vegetal comestible empleado.

Los factores de la extracción supercrítica que más influenciaron las variables respuesta evaluadas, fueron el porcentaje de etanol y la presión. El rendimiento de extracción, contenido total de fenoles y el porcentaje de inhibición de TBARS a los 6 días de oxidación, fueron respuestas influenciadas ascendentemente por los niveles más altos de cosolvente. El contenido de carotenos y la inhibición de HPL estuvieron más influenciadas por el mayor nivel en la presión.

Mediante el diseño experimental para EFS en las dos algas se logró determinar que los extractos 6 (30 MPa, 40 °C, 8% EtOH) y 8 (30 MPa, 60 °C, 8% EtOH) presentaron la mayor protección a la oxidación lipídica del aceite vegetal comestible empleado. Mientras que por la técnica tradicional, *H. musciformis* ofreció la mayor protección a la oxidación lipídica con el extracto etanólico-S6 y *G. mammillaris* con el extracto acetato de etilo-S4. Sin embargo, entre ambas técnicas extractivas la EFS mostró mayor selectividad para la obtención de extractos con actividad antioxidante.

La protección ofrecida en la etapa inicial de la oxidación fue más alta con los extractos de *H. musciformis*, mientras que la protección ofrecida contra algunas especies secundarias y finales de la oxidación (TBARS) fue mayor con los extractos de *G. mammillaris*.

La AA de los extractos Soxhlet a presión reducida correlacionaron aceptablemente con el CTF en *H. musciformis* y con el CTC en *G. mammillaris*. Mientras que de los extractos supercríticos únicamente correlacionaron el CTF con los TBARS en *G. mammillaris*.

El presente trabajo permitió determinar que las macroalgas rojas empleadas (*G. mammillaris* e *H. musciformis*), colectadas en el caribe colombiano, las cuales son una biomasa no aprovechada en nuestro país, son fuente promisoría de extractos capaces de proteger aceites comestibles de la oxidación lipídica, por lo tanto éstos podrían ser aprovechados por la industria aceitera. Se resalta que al obtener dichos extractos por una técnica verde, como es la EFS, éstos presentaron una mayor actividad antioxidante.

5.2 Recomendaciones

Con el fin de complementar los resultados obtenidos en la presente tesis, se realizan las siguientes recomendaciones:

Complementar las medidas de actividad antioxidante con técnicas que permitan determinar los volátiles generados, empleando p.e. microextracción en fases sólida-cromatografía de gases o cromatografía de gases-olfatometría. Adicionalmente, se sugiere determinar la AA de los extractos empleando otras técnicas de análisis (p.e. RANCIMAT).

Realizar un ensayo de toxicidad con los extractos de las algas objeto de estudio, así como de estabilidad de los extractos.

Estudiar en el aceite comestible el impacto sensorial ocasionado por la adición a éstos de los extractos de algas, mediante análisis sensorial.

Realizar la identificación de fenoles y carotenoides contenidos en las biomásas estudiadas, mediante técnicas cromatográficas.

La poca curvatura en la región para las superficies de respuesta, implica que el diseño estadístico no está tomando en cuenta el punto que maximiza la respuesta, esto implica moverse en la región de operabilidad para encontrar dicho punto y curvar la región experimental.

Bibliografía

- Al-Amoudi, O. a., Mutawie, H. H., Patel, A. V., & Blunden, G. (2009). Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah corniche algae, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16(1), 23–29. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2009.07.004>
- Albis-Salas, M. R., & Gavio, B. (2011). Notes on marine algae in the International Biosphere Reserve Seaflower, Caribbean Colombian I: new records of macroalgal epiphytes on the seagrass *Thalassia testudinum*. *Botanica Marina*, 54(6), 537–543. <http://doi.org/10.1515/BOT.2011.069>
- Álvares, E., Álvares, J., Balaña, R., Cabaleiro, T., Caride, A., Cascante, M., ... Franco, D. (2010). *Antioxidantes naturales. Aspectos saludables, toxicológicos y aplicaciones industriales*. (R. D. Franco & V. A. Moure, Eds.). Santiago de Compostela: Xunta de Galicia. Consellería del Medio Rural. .
- Alvarez, L. ., Pardo, P. M., & Trespacios, R. . (2007). Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del caribe y el Pacífico de Colombia: estado actual de su conocimiento. *Biosalud*, 6, 113–129.
- Álvarez, L. R., Pardo, P. C. M., & Trespacios, R. A. A. (2007). Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del Caribe y el Pacífico de Colombia: estado actual de su conocimiento. *Biosalud*, 6, 113–129.
- Andrade, K. S., Gonálvez, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-Do-Valle, R. M., Martínez, J., & Ferreira, S. R. S. (2012). Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, 88, 544–552. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.031>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127(1), 183–198. <http://doi.org/10.1039/b009171p>
- Araujo, L., Corao, G., Pérez, J., & Cova, J. (2004). Efecto tóxico del extracto de Alga roja *Gracilaria Mammillaris* en Células Mononucleares humanas de sangre periférica . *Revista de La Facultad de Farmacia* , 46(1), 47–50.
- Athukorala, Y., Lee, K. W., Park, E. J., Heo, M. S., Yeo, I. K., Lee, Y. D., & Jeon, Y. J.

- (2005). Reduction of lipid peroxidation and H₂O₂-mediated DNA damage by a red alga (*Grateloupia filicina*) methanolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(14), 2341–2348. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2246>
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 161–172.
- Balamurugan, M., & Selvam, G. G. (2013). Biochemical Study and GC-MS Analysis of *Hypnea musciformis* (Wulf.) Lamouroux. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 8(3), 117–123. <http://doi.org/10.5829/idosi.aejr.2013.8.3.12071>
- Bartosz, G., & Kolakowska, A. (2011). Lipid Oxidation in Food Systems. *Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipid*, 163–184. <http://doi.org/doi:10.1201/9781420031997.ch8>
- Batista, G. A. E., Charles, M. B., Mancini, F. J., & Vidal, N. A. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 1–18.
- Benelli, P., Riehl, C. A., Smania, A. J., Smania, E. F., & Ferreira, S. R. (2010). Bioactive extracts of orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) pomace obtained by SFE and low pressure techniques: Mathematical modeling and extract composition. *Journal of Supercritical Fluids*, 55(1), 132–141. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.08.015>
- Bhuvaneswari, S., Murugesan, S., Subha, T., Dharmotharan, R., & Shettu, N. (2013). In vitro antioxidant activity of marine red algae *Chondrococcus hornemanni* and *Spyridia fusiformis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(3), 82–85.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., & Prinsep, M. R. (2014). Marine natural products. *Natural Products Report*, 31, 160–258. <http://doi.org/10.1039/c3np70117d>
- Camacho, O., & Montaña, F. J. (2012). Cultivo experimental en el mar del alga roja *Hypnea Musciformis* en el área de Santa Marta. *Boletín de Investigaciones Marinas Y Costeras INVEMAR*, 41(1), 29–46.
- Castro, V. H. I. (2013). *Obtención de antioxidantes a partir de residuos frutícolas empleando extracción con fluidos supercríticos EFS*. Universidad Nacional de Colombia.
- Castro, Benelli, P., Ferreira, S. R. ., & Parada, A. F. (2013). Supercritical fluid extracts from

- tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 17–23. <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.10.006>
- Chakraborty, K., Joseph, D., & Praveen, N. K. (2013). Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Mannar of Peninsular India. *Journal of Food Science and Technology*, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s13197-013-1189-2>
- Chew, Y., Lim, Y., Omar, M., & Khoo, K. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT Food Science and Technology*, 41(6), 1067–1072. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.013>
- Cian, R. E., Caballero, M. S., Sabbag, N., González, R. J., & Drago, S. R. (2014). Bio-accessibility of bioactive compounds (ACE inhibitors and antioxidants) from extruded maize products added with a red seaweed *Porphyra columbina*. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 51–58. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.011>
- Cosenza, V. A., Navarro, D. A., Fissore, E. N., Rojas, A. M., & Stortz, C. A. (2014). Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. *Carbohydrate Polymers*, 102, 780–789. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.090>
- das Chagas Faustino Alves, M. G., Dore, C. M. P. G., Castro, A. J. G., do Nascimento, M. S., Cruz, A. K. M., Soriano, E. M., ... Leite, E. L. (2011). Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. *Journal of Applied Phycology*, 24(5), 1217–1227. <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9763-3>
- Devi, G. K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, F. A. A., & Anantharaman, P. (2011). In vitro antioxidant activities of selected seaweeds from Southeast coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(3), 205–11. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60070-9](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60070-9)
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Supercritical CO₂ extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2441–2469. <http://doi.org/10.1021/jf052858j>
- Díaz, P. G., & Díaz, R. M. (2003). Diversity of benthic marine algae of the Colombian

- Atlantic. *Biota Colombiana*, 4(2), 203–246.
- Echavarría, B. Z., Franco, A. S., & Martínez, A. M. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, 16(1), 126–131.
- El Gamal, A. a. (2010). Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 18(1), 1–25. <http://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
- Elalla, M. A., & Shalaby, A. (2009). Antioxidant Activity of Extract and Semi- Purified Fractions of Marine Red Macroalga Gracilaria Verrucosa. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3179–3185.
- Elena, M., Jáuregui, C., De, M., Calvo, C., & Romo, F. P. (2011). Carotenoides y su función antioxidante : Revisión, 61.
- FAO. (2015). Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios, 1–426. Retrieved from <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1187>
- Fernández, L. M., Fernández, L. A., Lozano, R. M., Ayuso, Y. M., González, G. J., & González, G. D. (2011). Antioxidantes naturales y capacidad antioxidante en Brassicas. *Actas de Horticultura*, 58, 191–194.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 10(1), 25–28. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00015-1](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00015-1)
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source. *Marine Drugs*, 11, 3754–3776. <http://doi.org/10.3390/md11103754>
- Frankel, E. N., Huang, S., Kanner, J., & German, J. B. (1994). Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants : Bulk Oils vs Emulsionst, 1054–1059.
- Frikha, F., Kammoun, M., & Hammami, N. (2011). Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia Composición química y algunas actividades biológicas de algas. *Ciencias* Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/ciemar/v37n2/v37n2a1.pdf>
- Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R., Belbahri, L., Gargouri, Y., ... Ben,

- R. F. (2011). Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez. *Ciencias Marinas*, 37, 113–124.
- Ganthavorn, C., & Hughes, J. S. (1997). Inhibition of Soybean Oil Oxidation By Extracts of Dry Beans (*Phaseolus Vulgaris*). *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74, 1025–1030.
- Garrido, F. D. P. (Universidad de C., & Parada, V. R. A. (Universidad de C. (2008). *Propiedades Antioxidantes y Funcionales de Cinco algas chilenas Sobre la Calidad de la pasta de salmón*. Universidad de Chile.
- Ghude, K. R., Ayre, A., Mane, P., Nemade, M., Gosavi, S., & Pathare, A. (2013). Supercritical Fluid Extraction-A Green Paradigm in the Area of Separation Science. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 2(23), 1–7.
- Gordon, M. H. (2001). Measuring antioxidant activity. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, & M. H. Gordon (Eds.), *Antioxidants in food: practical applications*. CRC Press.
- Grice, H. C. (1988). Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26(8), 717–723. [http://doi.org/10.1016/0278-6915\(88\)90072-5](http://doi.org/10.1016/0278-6915(88)90072-5)
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., & Andrade, P. B. (2015). Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*, 13(5), 3182–3230. <http://doi.org/10.3390/md13053182>
- Guedes, É. a. C., da Silva, T. G., Aguiar, J. S., de Barros, L. D., Pinotti, L. M., & Sant'Ana, A. E. G. (2013). Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(4), 668–673. <http://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000060>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4), 600–609. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004>
- Gutiérrez, P. ., & De la Vara, S. . (2008). Optimización de procesos con metodología de superficie de respuesta. In A. . del Bosque & V. . Roing (Eds.), *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda, pp. 384–420). México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.

<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Hernández, A. M. A., Castro, V. H. I., & Parada, A. F. (2011). Integrated Utilization of Guava (*Citrus*, 22(12), 2383–2390.
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. *Food Chemistry*, 98(1), 136–148. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>
- Herrero, M., Sánchez-Camargo, A. D. P., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2015). Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26–38. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>
- Howe, S. G. G., Vidal, A., Fallarero, A., Andrade-wartha, E. R. S. De, Mara, A., Oliveira, D., ... Mancini-filho, J. (2006). Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja, 42.
- Hurtado, A. N., & Domínguez, S. F. C. (2009). Análisis de correlación y regresión. *Probabilidad Y Estadística Para Ingeniería. Un Enfoque Moderno*, 1–88. Retrieved from <http://www.mcgraw-hill-educacion.com/pye01e/>
- Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., & Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41(2), 194–200. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.005>
- Jahurul, M., Akanda, H., Zaidul, M., Sarker, I., Ferdosh, S., Yazid, M., ... Kadir, A. (2012). Applications of Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Palm Oil and Oil from Natural Sources. *Molecules*, 1764–1794. <http://doi.org/10.3390/molecules17021764>
- Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K.-W., Heo, M.-S., Yeo, I.-K., Lee, Y.-D., & Jeon, Y.-J. (2004). Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 363–371. <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1044-9>
- Karawita, R., Siriwardhana, N., Lee, K. W., Heo, M. S., Yeo, I. K., Lee, Y. D., & Jeon, Y. J.

- (2005). Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 363–371. <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1044-9>
- Khairy, H. M., & El-Sheikh, M. a. (2015). Antioxidant activity and mineral composition of three Mediterranean common seaweeds from Abu-Qir Bay, Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 623–630. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.01.010>
- Kindleysides, S., Quek, S.-Y., & Miller, M. R. (2012). Inhibition of fish oil oxidation and the radical scavenging activity of New Zealand seaweed extracts. *Food Chemistry*, 133(4), 1624–1631. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.068>
- Kolakowska, A., & Sikorski, Z. Z. E. (2003). *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Danvers, USA: CRC Press.
- Kumari, P., Bijo, Mantri, A. J., Reddy, V. A., K, C. R., & Jha, B. (2013). Fatty acid profiling of tropical marine macroalgae: an analysis from chemotaxonomic and nutritional perspectives. *Phytochemistry*, 86, 44–56. <http://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.015>
- Li, K., Li, X.-M., Ji, N.-Y., & Wang, B.-G. (2007). Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* (Rhodomelaceae): structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(21), 6627–31. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.023>
- Lin, H.-C., Tsai, W.-S., & Chiu, T.-H. (2012). Antioxidant Properties of Seven Cultivated and Natural Edible Seaweed Extracts from Taiwan. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 21(3), 248–264. <http://doi.org/10.1080/10498850.2011.594211>
- López, G. L., De la Vega, M. R., & Sánchez, B. A. (2012). Extracción con fluidos supercríticos. *REDUCA*, 4(10), 142.
- Luque de Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1–2), 1–10. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
- Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Orsavova, J., Mlcek, J., Sochor, J., & Jurikova, T. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20(1), 1118–1133. <http://doi.org/10.3390/molecules20011118>

-
- Mahadevan, K. (2015). *Seaweed Sustainability*. *Seaweed Sustainability*. Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-418697-2.00013-1>
- Mahdi, S., Rahimi-nasrabadi, M., & Somayyeh, S. (2014). Supercritical Fluid Technology in Analytical Chemistry - Review, 3–28.
- McHugh, D. J. (2003). *A guide to the seaweed industry*. Roma: FAO Fisheries Technical Paper, N 441 .
- Mendiola, J. A., Herrero, M., Castro, P. M., & Ibáñez, E. (2013). Supercritical fluid extraction. In M. A. Rostagno & J. M. Prado (Eds.), *Natural product extraction: principles and applications* (pp. 196–225). Royal Society of Chemistry.
- Ministerio de salud de Colombia. Resolucion 4124 de 1991 (1991). Retrieved from https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_4124_1991.pdf
- Mohdaly, A. a a, Smetanska, I., Ramadan, M. F., Sarhan, M. a., & Mahmoud, A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 952–959. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.018>
- Momin, S. M. ., Aktar, M., & Mond, K. M. . (2013). Proximate chemical composition and aminoacid profile of two red seaweeds (*Hypnea pannosa* and *Hypnea musciformis*) collected from ST. Martin’s island, Bangladesh. *Journal of FisheriesSciences.com*, 7(2), 178–186. <http://doi.org/10.3153/jfsc.com.2013018>
- Morales, A. A. R., Fernández, P. M. D., & Menéndez, S. del V. R. (2010). Antioxidantes de origen marino. *Cuba: Medio Ambiente Y Desarrollo* , (19).
- Nagano, C., Moreno, F. B., Bloch Jr, C., Prates, M., Calvete, J., Saker-Sampaio, S., ... Sampaio, a. (2002). Purification and Characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea Musciformis*. *Protein & Peptide Letters*, 9(2), 159–165. <http://doi.org/10.2174/0929866023408931>
- Napolitano, H. (2001). Diseño de Experimentos. *Industria Y Química. Educación En Ciencias Química*, 354, 62–69.
- Nitschke, U., & Stengel, D. B. (2015). A new HPLC method for the detection of iodine applied to natural samples of edible seaweeds and commercial seaweed food products. *Food Chemistry*, 172, 326–334. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.030>

-
- Pan, Y., Zhang, X., Wang, H., Liang, Y., Zhu, J., Li, H., ... Wu, Q. (2007). Antioxidant potential of ethanolic extract of *Polygonum cuspidatum* and application in peanut oil. *Food Chemistry*, *105*(4), 1518–1524. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.039>
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2015). Seaweed proteins, peptides, and amino acids. *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*, 125–140. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-418697-2.00006-4>
- Parjikolaei, B., Cardoso, L., Fernandez-Ponce, M., Serano, C., Bruhn, A., Christensen, K., & Fretté, X. (2014). Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Planta Medica*, *80*. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1394616>
- Parsons, T. R., & Strickland, J. . (1963). Discussion of spectrophotometric determination of marine-plant pigments, with revised equations of ascertaining chlorophylls and carotenoids. *Journal of Mar Research*, *21*, 155–163.
- Parthiban, C., & Saranya, C. (2013). Evaluation of in vitro antioxidant properties of some selected seaweeds from Tuticorin coast. *Int. J. Curr. Microbiol. ...*, *2*(9), 64–73. Retrieved from http://www.researchgate.net/publication/256484042_Evaluation_of_in_vitro_antioxidant_properties_of_some_selected_seaweeds_from_Tuticorin_coast/file/3deec5230546e1f3f6.pdf
- Peralta, A., Reyes, N. A., Rangel, M. J., Nivia, Q. A., Mendoza, G. Á., Rodríguez, V. L., & Parada, A. F. (2011). Diseño y construcción de equipos de extracción con fluidos supercríticos (EFS) y algunas aplicaciones en análisis de alimentos. *Alimentos Hoy*. Retrieved from <http://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/105>
- Pereira, C. G., & Meireles, M. A. a. (2010). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food and Bioprocess Technology*, *3*(3), 340–372. <http://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>
- Pérez, P. E. M., Medina, R. G., Rodríguez, M. A., Padilla, N., & Lapenna, E. (2010). Estudio de la capacidad antioxidante de extractos crudos de varias especies de algas venezolanas . Study of antioxidant capacity of crude extracts from several seaweed species from Venezuela . *Revista de La Facultad de Farmacia*, *51*(2), 3–10.
- Pilavtepe, M., & Yesil-Celiktas, O. (2013). Mathematical modeling and mass transfer considerations in supercritical fluid extraction of *Posidonia oceanica* residues. *Journal*

-
- of *Supercritical Fluids*, 82(May 2010), 244–250.
<http://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.07.020>
- Pina, a. L., Costa, a. R., Lage-Yusty, M. a., & López-Hernández, J. (2014). An evaluation of edible red seaweed (*Chondrus crispus*) components and their modification during the cooking process. *LWT - Food Science and Technology*, 56(1), 175–180.
<http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.006>
- Plaza, del M. M. (2010). *Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales naturales procedentes de algas*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Pokorny, J., & Gordon, M. (2001). Antioxidantes de los alimentos.
- Polat, F., Dere, E., Gül, E., Yelkuvan, Í., Özdemir, Ö., & Bıngöl, G. (2013). The effect of 3-methylcholanthrene and butylated hydroxytoluene on glycogen...: EBSCOhost. *Turkish Journal of Biology*, 37, 33–38.
- Ramírez, B. C., Gómez, R. B., Suaterna, H. A., Martínez, G. J., Cardona, Z. L., & Rojano, B. (2012). Contenido de compuestos polares totales en aceites de cocina previo uso más vendidos en Medellín (Colombia). *Perspectivas En Nutrición Humana*, 14, 59–69.
- Ricardo Álvarez León Claudia Marcela Pardo Prado y Alba Alicia Trespalcios. (2007). Evaluación y utilización potencial de las macroalgas marinas del Caribe y el Pacífico de Colombia: estado actual de su conocimiento. *Biosalud*, 6, 113–129.
- Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2015). *Seaweed carbohydrates. Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-418697-2.00007-6>
- Rodríguez, P. J. M., Menéndez, L. J. R., & Trujillo, L. Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(1), 36–44.
- Romero, L., Guevara, M., D´armas, H., & Lodeyros, C. (2008). Cuantificación de carotenoides totales y β -caroteno en dos cepas de *dunaliella salina* (chlorophyta volvocales). *Instituto Bolivariano Oceanográfico*, 47(1), 67–76.
- Sabeena, F. K. H., & Jacobsen, C. (2013). Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1670–81. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.078>
- Sapkale, G. N., Patil, S. M., Surwase, U. S., & Bhatbhage, P. K. (2010). - a Review

- Supercritical Fluid Extraction, 8(2), 729–743.
- Sarojini, Y., Sujatha, B., & Rao, P. S. (2016). The variation in distribution of total phenols and antioxidant activity in five species of marine macro algae, 8(1), 30–37.
- Schmidt, É. C., Pereira, B., Rodrigo, W., Gouveia, C., Burle, G., Faria, G. S. M., ... Bouzon, Z. L. (2012). Responses of the macroalgae *Hypnea musciformis* after in vitro exposure to UV-B. *Aquatic Botany*, 100, 8–17. <http://doi.org/10.1016/j.aquabot.2012.03.004>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, (3), 357–385. <http://doi.org/10.1002/047167849X.bio050>
- Shareef, K. M., Sridharan, M. C., & Nazar, A. Y. (2012). Research Article Amino acids and fatty acids in *Hypnea musciformis*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4(12), 5089–5092.
- Sivagnanam, S., Yin, S., Choi, J., Park, Y., Woo, H., & Chun, B. (2015). Biological Properties of Fucoxanthin in Oil Recovered from Two Brown Seaweeds Using Supercritical CO₂ Extraction. *Marine Drugs*, 13(6), 3422–3442. <http://doi.org/10.3390/md13063422>
- Sreenivasan, S., Ibrahim, D., & Kassim, M. (2007). Free Radical Scavenging Activity and Total Phenolic content of *Gracilaria Changii*. *International Journal of Natural and Engineering Sciences*, 1(3), 115–117.
- Stengel, D. B., Connan, S., & Popper, Z. a. (2011). Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29(5), 483–501. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.016>
- Szydłowska-Czerniak, A., Trokowski, K., Karlovits, G., & Szlyk, E. (2011). Effect of refining processes on antioxidant capacity, total contents of phenolics and carotenoids in palm oils. *Food Chemistry*, 129(3), 1187–1192. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.101>
- Thinakaran, T., & Sivakumar, K. (2012). SEASONAL VARIATION AND BIOCHEMICAL STUDIES ON CERTAIN SEAWEEDS FROM PAMBAN COAST , GULF OF MANNAR BIOSPHERE RESERVE ., 2(1), 39–44.
- Thompson, D., & Moldéus, P. (1988). Cytotoxicity of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 37(11), 2201–

2207. [http://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90582-5](http://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90582-5)
- Valenzuela B, A., Sanhueza, J., & Nieto, S. (2007). Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas Y Aceites*, *54*(3), 295–303. <http://doi.org/10.3989/gya.2003.v54.i3.245>
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, *18*(1), 53–65.
- Venereo, G. J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, *31*(2), 126–133.
- Vidal, N. A., Motidome, M., Mancini, F. J., Tanae, M. M., Fallarero, L. A., Brandão, T. L., & Lapa, A. J. (2001). Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*, *37*(3), 373–382.
- Vijayabaskar, P., & Shiyamala, V. (2012). Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(1 SUPPL.), S90–S98. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60136-1](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60136-1)
- Villalobos, A., Calderón, L., Figueroa, C., Fierro, J., Otálora, G., & Álvarez, R. (2007). Evaluación por método econométrico de agar obtenido de algas rojas colombianas. *Universitas Scientiarum*, *12*(Edición especial III), 57–65.
- Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, *63*(3), 335–342. [http://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00025-9](http://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00025-9)
- Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Wang, H., Qu, S., & Zhang, Y. (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chemistry*, *128*(1), 93–99. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.082>
- Xu, T., Sutour, S., Casabianca, H., Tomi, F., Paoli, M., Garrido, M., ... Bighelli, A. (2015). Rapid Screening of Chemical Compositions of *Gracilaria dura* and *Hypnea muciformis* (Rhodophyta) from Corsican Lagoon. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, *2*(1), 8–8. <http://doi.org/10.15171/ijpni.2015.08>
- Yildiz, G., Vatan, Ö., Çelikler, S., & Dere, Ş. (2011). Determination of the Phenolic Compounds and Antioxidative Capacity in Red Algae *Gracilaria bursa-pastoris*.

International Journal of Food Properties, 14(3), 496–502.
<http://doi.org/10.1080/10942910903256949>

Anexos

Anexo A: Modelo cuadrático del % de inhibición de HPL y TBARS EFS con extractos EFS del alga *G. mammillaris*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para el % de inhibición de los HPL a los 6 días de oxidación con extractos del alga *G. mammillaris* es:

$$\% \text{ Inhibición HPL} = 83,1298 - 2,05692*T - 3,90786*E - 1,55274*P + 0,0164555*T^2 + 0,0106175*T*E + 0,0146232*T*P + 0,273013*E^2 + 0,0481879*E*P + 0,0232101*P^2.$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para el % de inhibición de los TBARS con extractos del alga *G. mammillaris* es:

$$\% \text{ Inhibición TBARS (144 h)} = 57,9553 - 1,69337*T - 0,276697*P - 0,847353*E + 0,0130863*T^2 + 0,0119273*T*P + 0,0344925*T*E - 0,00752927*P^2 + 0,078564*P*E + 0,0334582*E^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el % inhibición (día 6) de (1) HPL y (2) TBARS con *G. mammillaris*.

Término	Coefficientes Reg. (1)	Coefficientes Reg. (2)	p-valor (1)	p-valor (2)
constante	83,1298	57,9553		
A:Temperatura (°C)	-2,05692	-1,69337	0,3804	0,8075
B:% EtOH	-3,90786	-0,847353	0,2155	0,0000
C:Presión (MPa)	-1,55274	-0,276697	0,0009	0,0035
AA	0,0164555	0,0130863	0,2588	0,5299
AB	0,0106175	0,0119273	0,6990	0,3349
AC	0,0146232	0,0344925	0,1001	0,3997
BB	0,273013	-0,00752927	0,1054	0,7157
BC	0,0481879	0,078564	0,1034	0,0749
CC	0,0232101	0,0334582	0,1233	0,8838

Anexo B: Modelo cuadrático del % de rendimiento con los extractos EFS del alga *G. mammillaris*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para % de rendimiento en el alga *G. mammillaris* es:

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendimiento (bs)} = & 6,49659 - 0,197761 * T - 0,107614 * P - 0,436919 * E + 0,00162577 * T^2 \\ & + 0,001025 * T * P + 0,00541667 * T * E + 0,00172577 * P^2 + 0,00366667 * P * E + 0,0308419 * \\ & E^2 \end{aligned}$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el % de rendimiento.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	0.242607	
A:Presión	0.0830926	0,0183
B:EtOH	-0.0999742	0,0002
C:Temperatura	-0.0344435	0,2795
AA	0.000742268	0,4506
AB	-0.00166667	0,4170
AC	-0.001725	0,2104
BB	0.0199141	0,4242
BC	0.00158333	0,3851
CC	0.000642268	0,2111

Anexo C: Modelo cuadrático del CTF con los extractos EFS del alga *G. mammillaris*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para CTF en el alga *G. mammillaris* es:

$$\text{CTF} = -5,56253 + 0,152613 \cdot P + 0,260041 \cdot E + 0,164353 \cdot T - 0,00131474 \cdot P^2 - 0,00262917 \cdot P \cdot E - 0,00064875 \cdot P \cdot T + 0,0100584 \cdot E^2 + 0,000479167 \cdot E \cdot T - 0,00142474 \cdot T^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el CTF.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	-5,56253	
A:Presión	0,152613	0,0000
B:EtOH	0,260041	0,0000
C:Temperatura	0,164353	0,0343
AA	-0,00131474	0,1639
AB	-0,00262917	0,1541
AC	-0,00064875	0,2326
BB	0,0100584	0,3239
BC	0,000479167	0,7832
CC	-0,00142474	0,1349

Anexo D: Modelo cuadrático del CTC con los extractos EFS del alga *G. mammillaris*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para CTC en el alga *G. mammillaris* es:

$$\text{CTC} = -12,9067 + 0,288048*P + 1,60115*E + 0,345095*T - 0,00717862*P^2 - 0,00255875*P*E + 0,00171725*P*T - 0,123176*E^2 - 0,00400369*E*T - 0,00359671*T^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el CTC.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	-12,9067	
A:Presión	0,288048	0,0173
B:EtOH	1,60115	0,1971
C:Temperatura	0,345095	0,9924
AA	-0,00717862	0,1740
AB	-0,00255875	0,7932
AC	0,00171725	0,5606
BB	-0,123176	0,0486
BC	-0,00400369	0,6825
CC	-0,00359671	0,4784

Anexo E: Modelo cuadrático del % de inhibición de HPL y TBARS EFS con extractos EFS del alga *H. musciformis*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para el % de inhibición de los HPL (día 6 de oxidación) con el alga *H. musciformis* es:

$$\% \text{ Inhibición HPL} = 44,5635 - 1,06433*T - 5,27381*E + 0,528539*P + 0,00928746*T^2 + 0,0543562*T*E + 0,0039467*T*P + 0,188909*E^2 + 0,0666716*E*P - 0,0183765*P^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para el % de inhibición de los TBARS con el alga *H. musciformis* es:

$$\% \text{ Inhibición TBARS} = -16,5504 + 0,810559*T + 0,600883*E + 0,378688*P - 0,000565504*T^2 - 0,112646*T*E - 0,0042131*T*P + 0,471163*E^2 + 0,0838218*E*P - 0,00531974*P^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el % inhibición en el día 6 de oxidación de (1) HPL y (2) TBARS en *H. musciformis*.

Término	Coefficientes Reg. (1)	Coefficientes Reg. (2)	p-valor (1)	p-valor (2)
constante	44,5635	-16,5504		
A:Temperatura (°C)	-1,06433	0,810559	0,0338	0,3517
B:% EtOH	-5,27381	0,600883	0,0447	0,0054
C:Presión (MPa)	0,528539	0,378688	0,0048	0,0084
AA	0,00928746	-0,000565504	0,5812	0,9789
AB	0,0543562	-0,112646	0,1211	0,0230
AC	0,0039467	-0,0042131	0,6857	0,7355
BB	0,188909	0,471163	0,3234	0,0746
BC	0,0666716	0,0838218	0,0661	0,0702
CC	-0,0183765	-0,00531974	0,2883	0,8036

Anexo F: Modelo cuadrático del % de rendimiento con los extractos EFS del alga *H. musciformis*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para % de rendimiento con el alga *H. musciformis* es:

$$\% \text{ Rendimiento (bs)} = 0,794901 - 0,0459798*T + 0,0494881*P - 0,0208294*E + 0,000535714*T^2 + 0,0000625*T*P - 0,00120833*T*E - 0,000814286*P^2 - 0,000708333*P*E + 0,0198413*E^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para % de rendimiento.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	0,794901	
A:Presión	-0,0459798	0,0433
B:EtOH	0,0494881	0,0020
C:Temperatura	-0,0208294	0,6947
AA	0,000535714	0,6958
AB	0,0000625	0,9372
AC	-0,00120833	0,6500
BB	-0,000814286	0,5549
BC	-0,000708333	0,7893
CC	0,0198413	0,2136

Anexo G: Modelo cuadrático del CTF con los extractos EFS del alga *H. musciformis*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para CTF con el alga *H. musciformis* es:

$$\text{CTF} = 2,04418 + 0,0919452*P + 0,368946*E - 0,125015*T - 0,00216071*P^2 - 0,00588333*P*E + 0,00174*P*T + 0,0149921*E^2 - 0,00206667*E*T + 0,00109929*T^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el CTF.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	2,04418	
A:Presión	0,0919452	0,0195
B:EtOH	0,368946	0,0033
C:Temperatura	-0,125015	0,6764
AA	-0,00216071	0,6176
AB	-0,00588333	0,4869
AC	0,00174	0,4929
BB	0,0149921	0,7541
BC	-0,00206667	0,8044
CC	0,00109929	0,7983

Anexo H: Modelo cuadrático del CTC con los extractos EFS del alga *H. musciformis*

La ecuación de regresión que se ajusta a los datos, de acuerdo al modelo estadístico, para CTC con el alga *H. musciformis* es:

$$\text{CTC} = 23,0423 + 0,0703079*P + 0,460051*E - 0,830922*T - 0,00403632*P^2 - 0,0180227*P*E + 0,0054029*P*T - 0,0355131*E^2 + 0,00580697*E*T + 0,00640294*T^2$$

Donde P es presión, T es temperatura y E corresponde a porcentaje de etanol.

Coefficientes de regresión y análisis de varianza para el CTC.

Término	Coefficientes de Regresión	p-valor
Constante	23,0423	
A:Presión	0,0703079	0,0138
B:EtOH	0,460051	0,7217
C:Temperatura	-0,830922	0,0952
AA	-0,00403632	0,4790
AB	-0,0180227	0,1259
AC	0,0054029	0,1261
BB	-0,0355131	0,5728
BC	0,00580697	0,5969
CC	0,00640294	0,2727


Productos académicos

Artículos

1. M. Ospina, H.I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso (2016). Antioxidant capacity of colombian seaweeds: 1. Extracts obtained from *Gracilaria mammillaris* by means of supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*. Sometido.
2. M. Ospina, H.I. Castro-Vargas, G. Rozo, L. I. Rodríguez, F. Parada-Alfonso (2016). Antioxidant capacity of colombian seaweeds: 2. Extracts obtained from *Hypnea musciformis* by means of supercritical fluid extraction. *Food Sci. Biotechnol.* Artículo en preparación.
3. G. Rozo, C. Rozo, M. Ospina, F. Parada-Alfonso, M. Puyana (2016). Valor nutricional y ácidos grasos presentes en las macroalgas *Gracilaria mammillaris* e *Hypnea musciformis*. *Revista Colombiana de ciencias químicas*. Artículo en preparación.

Presentaciones en congreso


1. Póster "Análisis proximal de dos especies de algas colombianas y su potencial valor nutricional". CIPNat2016. M.Y. Ospina, H.I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso, G. Rozo.



Análisis proximal de dos especies de algas colombianas y su potencial valor nutricional

M.Y. Ospina¹, H.I. Castro-Vargas², G. Rozo Torres³, F Parada A^{2*}

¹Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos-Facultad de Agronomía-Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá
²Departamento de Química-Facultad de Ciencias-Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá *Email: fparada@unal.edu.co
³Departamento de Ciencias Básicas-Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad de Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia




Resúmen

El análisis proximal, el contenido total de fenoles y de carotenoides en dos macroalgas rojas del Caribe colombiano, *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux y *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe, hacen evidente que estas algas comestibles, tienen un potencial valor nutricional para el consumo humano. Habitantes del sudeste asiático e islas del Pacífico, tienen una fuerte tradición de consumo de algas en seco y en fresco, sin embargo hay desconocimiento del valor nutricional de éstas. Los resultados de este estudio revelan que las dos algas del Caribe colombiano son buena fuente de compuestos funcionales (fibra dietaria total) y macronutrientes como proteínas, por lo que se sugieren como ingrediente funcional con alto valor nutricional para la industria de alimentos.

Abstract


Proximate analysis, the total content of phenols and of the carotenoids in two red seaweeds of the Colombian Caribbean, *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux and *Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe, show that these edible seaweeds, have a potential nutritional value for human consumption. Inhabitants of Southeast Asia and the Pacific Islands, have a strong tradition of consuming algae dry and cool, however there is a lack of nutritional value of these. The results of this study reveal that the two Colombian Caribbean seaweeds are good source of functional compounds (total dietary fiber) and macronutrients like proteins; therefore they are suggested as a functional ingredient with high nutritional value to the food industry.



***Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux**

Objetivo

Evaluar el valor nutricional de las algas *H. musciformis* y *G. mammillaris*, determinando los respectivos análisis proximal, y contenidos de fenoles y de β -caroteno.



***Gracilaria mammillaris* (Montagne) M.A. Howe**

Metodología

Recolección

• Julio de 2014. Litoral rocoso de la playa del aeropuerto de Santa María, Colombia, Universidad Jorge T. Lozano

Preparación

• Lavado con agua destilada
• Secado en horno a 50°C por 48 h
• Molienda

Análisis proximal (AOAC 2000)

• Humedad: Estufa de vacío a 60 °C por 24 h.
• Cenizas: Mufla a 600 °C
• Lípidos: Goldfish con éter de petróleo.
• Proteína: Kjeldahl con factor de 6,25 para convertir nitrógeno total en proteína cruda.
• Fibra dietaria total: Método enzimático-gravimétrico.
• Carbohidratos: la diferencia entre 100 y sumatoria de los anteriores valores.

Extracción soabiles

• Con etanol a presión reducida por 7 h (40 °C y 0,18 atm).

Contenido de fenoles

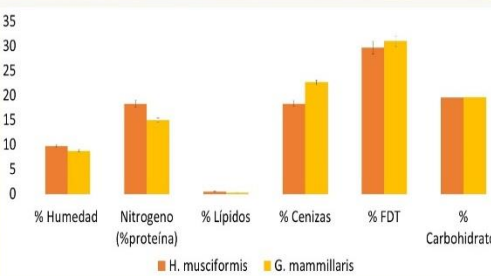
• Metodología de Folin Ciocalteu a 765 nm.

Contenido de β -caroteno

• Según metodología de Parsons & Strickland (1972) en Dere (2003) a 480 nm.

Resultados

Análisis proximal de *H. musciformis* y *G. mammillaris*



El consumo diario promedio de β -caroteno natural, a partir de fuentes naturales se estimó en alrededor de 2— 5 mg/día [9]. Como referencia, la espinaca contiene 5,63 mg/100 g o el brócoli 0,36 mg/100 g [11].

Comparación del análisis proximal vs otros estudios

Macroalga	% Humedad	% Proteína	% Lípidos	% Cenizas	% FDT	% Carbohidratos	Ref.
<i>H. musciformis</i>	9,66	18,27	0,45	18,28	29,63	20,50	Ospina et al.
<i>H. musciformis</i>	11,54	18,64	1,27	21,57	37,92	20,60	[2]
<i>H. musciformis</i>	14,17	17,12	0,33	14,14	-	54,24	[3]
<i>G. mammillaris</i>	8,71	14,90	0,25	22,65	31,01	19,60	Ospina et al.
<i>G. salicornia</i>	9,98	9,58	2,00	38,91	10,40	-	[4]
<i>G. crassa</i>	-	6,90	3,30	22,70	24,70	-	[5]

Referencias

¹AOAC International. 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Maryland 17: Baltimore.

²Sidiqee et al. 2013. *Journal of Fisheries Sciences*, 7(2), 178-186.

³Castro et al. 2014. *Acta Scientiarum*, 36(2), 137.

⁴Tahara et al. 2012. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2500-2506.

⁵Noorah et al. 2009. *Food chemistry*, 08, 69-76.

⁶Chakraborty et al. 2013. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(12), 2500-2506.

⁷Francavilla et al. 2013. *Marine Drugs*, 11, 3754-3776.

⁸Thirakaran et al. *Int. J. Res. Biol. Sci.* 2, 39-44

⁹Khairy et al. 2015. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5), 623-630.

¹⁰Schmidt et al. 2012. *Acta Scientiarum, Biological Sciences*, 36(2), 137.

¹¹USDA. 2010. National nutrient database for standard reference. Composition of foods raw, processed, prepared.

Comparación del contenido total de fenoles y β -caroteno vs otros estudios

Macroalga	Fenoles totales mg EAG/g (dw)	mg β -caroteno/g (dw)	Ref.
<i>H. musciformis</i>	349,66 \pm 4,11	1,80 \pm 0,12	Ospina et al.
<i>G. mammillaris</i>	470,70 \pm 9,92	1,04 \pm 0,03	Ospina et al.
<i>H. musciformis</i>	205,48 \pm 2,40	-	[6]
<i>G. gracilis</i>	65,00	-	[7]
<i>G. corticata</i>	-	0,43	[8]
<i>H. musciformis</i>	-	0,66 \pm 0,07	[9]

Agradecimientos

Fundación Juan Pablo Gutiérrez Cáceres, Universidad Jorge Tadeo Lozano (Convocatoria de investigación 10-2013), Universidad Nacional de Colombia (project No. 201010023413), Colciencias (Convocatoria nacional jóvenes investigadores e innovadores, 2014).

2. Póster “Supercritical extraction of a Colombian caribbean seaweed and its antioxidant capacity”. Prosciba2016. M.Y. Ospina, G. Rozo, H.I. Castro, M. Puyana, F. Parada.



Supercritical extraction of a Colombian Caribbean seaweed and its antioxidant capacity



M.Y. Ospina^a, G. Rozo Torres^b, H.I. Castro-Vargas^a, M. Puyana Egedus^b, F. Parada Alfonso^{a*}

^a Departamento de Química-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia (*fparadar@unal.edu.co)

^b Departamento de Ciencias Básicas-Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Bogotá, Colombia (gladys.rozo@utadeo.edu.co)

ABSTRACT

In this study were obtained extracts from red macroalgae (*Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux) by supercritical fluid extraction-SFE using CO₂ and ethanol (EtOH) at different conditions (temperature 40, 50, 60°C; pressure 100, 200, 300 atm; EtOH percentage 2, 5, 8%_{w/w}). The yield and the antioxidant activity of extracts were determined. The highest yield was obtained at 60°C, 100 atm, 8% of EtOH (1.24% dw). The highest reducing capacity of DPPH radical was shown by the extract obtained at 60°C, 300 atm, 8% of EtOH (81% of DPPH inhibition). On the FRAP assay the highest reduction efficiency was exhibited by the extract obtained at 60 °C, 300 atm, 2% EtOH (144.833 mol Trolox/g dw).

INTRODUCTION

The antioxidant extraction from natural products by SFE has been used frequently [1]. Given that seaweeds have efficient defense systems against oxidative damage, they are a promising source of extracts with antioxidant activity [1].

Macroalgae synthesizes and accumulates photoprotective compounds such as chlorophylls, carotenoids and xanthophylls; in red algae, have been reported terpenes and halogenated phenolic compounds as responsible for trapping free radicals, which confers antioxidant activity [2]. However studies about the antioxidant activity of edible red seaweed *H. musciformis* have been limited [3].

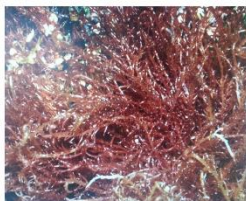


Figure 1. *H. musciformis* seaweed

MATERIALS & METHODS

The aim of this work was to determine the yield and the antioxidant activity of extracts from *H. musciformis* obtained by SFE (CO₂-EtOH).

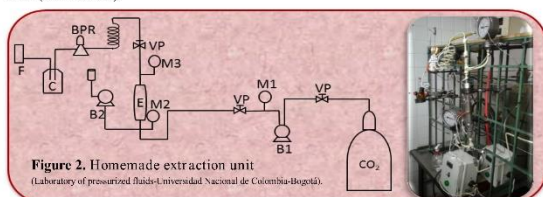


Figure 2. Homemade extraction unit (Laboratory of pressurized fluids, Universidad Nacional de Colombia-Bogotá).

SFE

- Extraction in continuous mode (Figure 2).
- CO₂-EtOH (40, 50 and 60 °C; 100, 200 and 300 atm; 2, 5 and 8%_{w/w}) by a central composite design with 8 factorial points, 6 axial points with $\alpha=1$ and 1 central point (Table 1).
- An extraction curve was conducted to determine the time of depletion of analytes (Figure 3).

Antioxidant activity (AA)

- Reducing of the synthetic radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) was determined according to the method [4].
- Ferric reducing antioxidant power (FRAP) was assay according to the method [4].

RESULTS & DISCUSSION

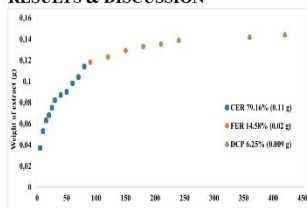


Figure 3. Extraction curve

CER: Constant extraction rate; FER: Falling ER; DCF: Diffusion control/ed period.

Pressure	Temperature	% EtOH	Extract
-	-	-	1
+	-	-	11
-	+	-	2
+	+	-	12
-	-	+	3
+	-	+	13
-	+	+	4
+	+	+	14
-	0	0	5
+	0	0	15
0	-	0	6
0	+	0	9
0	0	-	7
0	0	+	10
0	0	0	8

Table 1. Experimental design

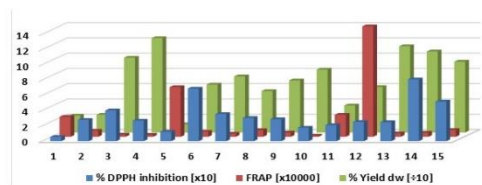


Figure 4. AA and yields of extracts

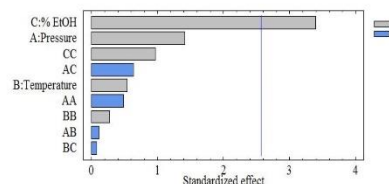


Figure 5. Standardized Pareto chart for % Yield

According to the figure 3, all extractions were performed to 240 minutes. The highest yields were obtained at 8% EtOH (figure 4); % cosolvent being the variable that most influenced the extraction efficiency (figure 5).

The highest reducing capacity of DPPH radical was shown by the extract obtained at 300 atm, 60 °C, and 8% of EtOH (extract 14), the inhibition of DPPH was 81%. On the FRAP assay the highest reduction efficiency was exhibited by the extract obtained at 60 °C, 300 atm and 2% EtOH (extract 12) with 144.833 μmol Trolox/g dw. The higher pressure increases the density of CO₂ and therefore its power solvent, on the other hand, the temperature at the highest level, allows the vapor pressure of the solute increases and the addition of EtOH at its highest level allows a higher concentration of polar solutes [5].

CONCLUSIONS

The higher content of solvent (8% EtOH) allows to obtain extracts possibly dragged compounds of higher polarity, whereby these extracts were more likely to reduce DPPH radical and ferric complex, possibly attributed to the presence of phenolic compounds medium polarity. These results evidence to *H. musciformis* as a potential source of compounds with antioxidant capacity in vitro.

ACKNOWLEDGEMENT

Universidad Jorge Tadeo Lozano (Convocatoria de investigación 10-2013). Universidad Nacional de Colombia (project No. 201010023413). Coleciencias (Convocatoria nacional jóvenes investigadores e innovadores, 2014). Foundation Juan Pablo Gutiérrez Cáceres.

REFERENCES

- [1] Herrero, M., & Ibáñez, E. 2015. Green processes and sustainability: An overview on the extraction of high added-value products from seaweeds and microalgae. *J. Supercrit. Fluids*, 96, 211-216.
- [2] Blunt, J.W., Copp, B., Keyzers, R., Munro, M., Prinsep, M.R. 2014. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 31, 160-256.
- [3] Chakraborty, K., Joseph, D., & Praveen, N. K. 2013. Antioxidant activities and phenolic contents of three red seaweeds (Division: Rhodophyta) harvested from the Gulf of Marmar of Peninsular India. *J. Food Sci. Tech.*, 1-12.
- [4] Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Schoerens, J. C., & Miller, A. R. 2006. Modified 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 1151-1157.
- [5] Irujo de Castro, M., Valcárcel, M., Tena, M. T. 1993. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. Reverté.

3. Póster “Capacidad reductora y contenido de fenoles de extractos de algas del Caribe colombiano obtenidos empleando extracción supercrítica y técnicas tradicionales”. COLACRO2014. M.Y. Ospina, H.I. Castro-Vargas, F. Parada-Alfonso, G. Rozo Torres.



XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines
y VII Congreso Colombiano de Cromatografía



P-AB-49

Capacidad reductora y contenido de fenoles de extractos de algas del Caribe colombiano obtenidos empleando extracción supercrítica y técnicas tradicionales

M.Y. Ospina¹, H.I. Castro-Vargas¹, F. Parada-Alfonso¹, G. Rozo Torres^{2*}

¹Departamento de Química-Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia

² Grupo de Bioprospección-Departamento de Ciencias Básicas-Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano.

*E-mail: gladys.rozo@utadeo.edu.co

La capacidad reductora y el contenido de fenoles totales de extractos obtenidos a partir de algas del Caribe colombiano fueron explorados. El alga *Hypneamusciformis* (Wulfen) Lamoroux fue estudiada como fuente de extractos fenólicos con capacidad para reducir el radical sintético 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Los extractos fueron obtenidos empleando extracción Soxhlet con etanol y acetato de etilo y extracción con fluidos supercríticos (EFS) con dióxido de carbono (CO₂). La EFS fue llevada a cabo a 100 bar y 40 °C.

El contenido total de fenoles (CTF) y la capacidad reductora del DPPH de los extractos obtenidos por los diferentes métodos fueron comparados, esto permitió identificar la metodología más promisoría para la obtención de antioxidantes a partir de las *H.musciformis*. Los resultados permiten visualizar el potencial de algunas algas del Caribe colombiano como fuentes de extractos con actividad antioxidante *in vitro* y su potencial aplicación en sistemas *in vivo* y en alimentos.

Palabras clave: *Hypneamusciformis* (Wulfen) Lamoroux, extracción supercrítica, contenido de fenoles totales, actividad antioxidante.

Agradecimientos: A la Universidad Jorge Tadeo Lozano (convocatoria de investigación 10-2013 por la financiación del proyecto).

Alimentos y Bebidas