

 EDUCACIÓN <small>SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA</small>	SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO	
	INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO	
	<i>Portada del Proyecto de Residencias Profesionales</i>	

Nombre del Proyecto:
 Evaluación del método de extracción de polifenoles con capacidad antimicrobiana en algas de Boca del Río.

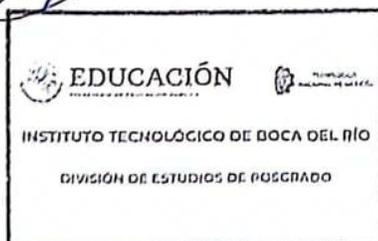
Nombre del Alumno
 Alondra Liset Hernández Solís

Número de Control
 19990283

Nombre de la Carrera
 Lic. Biología

Especialidad
 Biología marina


 Ignacio Alejandro Pérez Legaspi




 Eugenio Rangel León



Boca del Río, Veracruz a 15 de diciembre del 2023

Agradecimientos

Inicialmente agradezco a mis padres por el apoyo y la motivación para lograr llegar a este punto importante en mis estudios universitarios. A los maestros que me aportaron conocimientos y enseñanzas durante la carrera. Al Instituto Tecnológico de Boca del Río por permitirme el uso de sus instalaciones para realizar el presente trabajo de investigación.

A mis asesores el Prof. Eugenio Rangel León por darme la oportunidad de ser participe en su proyecto de investigación y el Doc. Ignacio Alejandro Pérez Legaspi por su apoyo durante la realización de mi Residencia Profesional. Por último, agradezco a mis compañeros y amigos por acompañarme en esta trayectoria donde creamos momentos memorables que siempre recordare con mucho cariño.

Resumen

Las algas marinas desempeñan un papel muy importante en los ecosistemas acuáticos, es por ello que existe estudios científicos debido a los compuestos bioactivos que presentan organismos fotosintéticos y su importancia en la salud humana ya que presentan compuestos polifenólicos con capacidades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, entre otras. El presente trabajo busca evaluar dos métodos de extracción de estos compuestos polifenólicos (Soxhlet y maceración) con el fin de demostrar las potenciales capacidades que presentan estos organismos, los cuales también se encuentran coexistiendo en las playas de Boca del Río en Veracruz.

Se determino la concentración de polifenoles totales expresados en miligramos equivalentes de ácido sobre litro en algas de la especie *Ulva lactuca*, *Gracilaria mammalis* y *Gracilaria bursa-pastoris* donde se demostró que existe una diferencia significativa en ambos métodos de extracción siendo el método por maceración el más eficaz, sin embargo, este método se potencializo con sonicación teniendo mayores resultados. *U. lactuca* obtuvo la mayor concentración de polifenoles totales con 9.32 gEAG/L por el método potencializado de maceración y para el método Soxhlet obtuvo 3.33 gEAG/L, *G. mammalis* y *G. bursa-pastoris* tuvieron concentraciones más bajas en ambos métodos con 3.62 y 2.84, 3.17 y 2.33 gEAG/L respectivamente. También demostraron inhibiciones considerablemente altas del radical ABTS para la determinación de actividad antioxidante con 68.29% en *U. lactuca*, 53.33% en *G. mammalis* y 48.15% en *G. bursa-pastoris*.

Índice

Introducción	1
Descripción de la empresa u organización	2
Problemas a resolver	7
Objetivos	8
Justificación	9
Marco teórico	10
Compuestos bioactivos en algas marinas	10
<i>Compuestos polifenólicos.....</i>	<i>10</i>
<i>Factores que afectan la concentración de polifenoles.....</i>	<i>11</i>
<i>Métodos de extracción convencionales.....</i>	<i>12</i>
<i>Extracción por el método Soxhlet.....</i>	<i>12</i>
<i>Extracción por el método de maceración</i>	<i>13</i>
Métodos de extracción no convencionales	14
<i>Extracción Asistida por Ultrasonido.....</i>	<i>14</i>
Determinación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu.....	15
Actividad antimicrobiana en algas	16
<i>Determinación de actividad antimicrobiana</i>	<i>17</i>
Actividad antioxidante en algas	18
<i>Determinación de actividad antioxidante</i>	<i>19</i>

Procedimiento y descripción de las actividades realizadas	22
Resultados	35
Conclusiones y recomendaciones	39
Competencias desarrolladas.....	40
Fuentes de información	41

Índice de tablas

Tabla 1.	24
Tabla 2.	32

Índice de figuras

Figura 1	22
Figura 2	22
Figura 3	23
<i>Figura 4</i>	23
Figura 5	24
Figura 6	24
Figura 7	25
Figura 8	26
Figura 9	26
Figura 10	27
Figura 11	28
Figura 12	28
Figura 13	29
Figura 14	30
Figura 15	30
Figura 16	31
Figura 17	32
Figura 18	33
Figura 19	34
Figura 20	36
Figura 21	37
Figura 22	38

Introducción

Las algas marinas son organismos fotosintéticos que desempeñan un papel crucial en los ecosistemas acuáticos. Además de su importancia biológica, las algas marinas han atraído la atención en la investigación científica debido a sus compuestos bioactivos, como los polifenoles, que han mostrado propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antibacterianas, anticancerígenas, entre otras.

Se ha demostrado que las algas marinas han desarrollado fuertes sistemas antioxidantes en respuesta a las condiciones altamente oxidativas en que viven.

Como organismos fotosintéticos, las algas están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, lo cual permite la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes (Vidal *et al.*, 2009). Las algas presentan bajo contenido calórico, alta concentración de proteínas, fibra dietética, minerales y vitaminas, también contienen compuestos bioactivos tales como polifenoles y carotenoides, por otra parte, su consumo está asociado a baja incidencia de muchas enfermedades (Cuesta *et al.*, 2016).

Las algas sintetizan como producto de su metabolismo secundario a los polifenoles, estos pertenecen a un grupo heterogéneo de moléculas químicas las cuales se caracterizan por tener uno o más anillos fenólicos sustituidos por funciones hidroxílicas (Quitral *et al.*, 2012). Existe un enorme interés científico por las propiedades de los polifenoles en la prevención de patologías relacionadas con el envejecimiento, males cardiovasculares y cáncer.

En el presente trabajo se evaluarán dos métodos de extracción de polifenoles presentes en algas marinas el primero por el método de Soxhlet y maceración

repetida, y posteriormente determinar polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Descripción de la empresa u organización

Historia

La educación en Ciencias y Tecnología del Mar tuvo su origen a nivel nacional en el año de 1957, en la ciudad de Veracruz en el seno de una prestigiosa institución educativa que hoy es el Instituto Tecnológico de Veracruz, la creación del Instituto Tecnológico del Mar es el resultado de la evaluación de dos etapas previas para consolidarse: primero fue la creación de la Estación Marina, la cual funcionó como el origen de (1957 a 1965), con su adscripción al Instituto Tecnológico Regional de Veracruz; el segundo su transformación para convertirse en el Centro Nacional de Ciencias y Tecnologías Marinas (1966 a 1974). A partir de septiembre de 1975, la institución por Acuerdo Presidencial se transformó en el Instituto Tecnológico de Pesca, cuyo nombre cambió a Instituto de Estudios Superiores en Ciencia y Tecnología del Mar y finalmente en 1981, se designó como Instituto Tecnológico del Mar con la reestructuración de la SEP, como parte del proceso integrador en octubre del 2005, nuestro plantel posee una nueva imagen institucional tomando su nuevo nombre de INSTITUTO TECNOLÓGICO DE BOCA DEL RÍO, siendo parte del Sistema Nacional de Educación Superior Tecnológica, el cual posteriormente cambia a Tecnológico Nacional de México (TecNM, 2020a).

Objetivo

Ofrecer herramientas para las siguientes generaciones; con la finalidad de desarrollar conocimientos y capacidades de acuerdo a sus intereses personales (TecNM, 2020b).

Misión

Contribuir a la conformación de una sociedad más justa, humana y con amplia cultura científico-tecnológica, mediante una educación equitativa en su cobertura y de alta calidad (TecNM, 2020b).

Visión

Ser un Instituto Tecnológico de alto desempeño que sea soporte del desarrollo acuícola e industrial sostenido, sustentable y equitativo de la región, de la nación y del fortalecimiento de su diversidad cultural (TecNM, 2020b).

Valores

A fin de orientar y guiar las acciones cotidianas de todo su personal, el Instituto Tecnológico de Boca del Río define los siguientes valores Institucionales:

- Respeto: Miramiento, consideración, deferencia.
- Puntualidad: Disciplina de estar a tiempo para cumplir nuestras obligaciones.
- Honestidad: Calidad humana por la que la persona se determina a elegir
- actuar siempre con base en la verdad y en la auténtica justicia, dando a cada quien lo que le corresponde, incluida ella misma.

- Tolerancia: Respeto a las ideas, creencias o prácticas de los demás cuando son diferentes o contrarias a las propias.
- Responsabilidad: Es una obligación, ya sea moral o incluso legal de cumplir con lo que se ha comprometido.

Código de ética

El Tecnológico Nacional de México (TecNM) es una dependencia educativa con reconocimiento a nivel nacional e internacional, donde se educan a los profesionistas y posgraduados que la sociedad requiere para el desarrollo del país. Todo el personal que colabora dentro del TecNM tiene el firme compromiso con la sociedad de ofrecer una educación de excelencia en forma gratuita, el TecNM establece el compromiso de que el personal desempeña su trabajo con base en los valores y principios éticos contenidos en el Código de ética y de Conducta que garantizan el orden, la seguridad, la igualdad y no discriminación establecida en la NMXR-025-SCFI-2015 y en el Programa Institucional de Innovación y Desarrollo 2013-2018 (PIID), en su estrategia transversal III.1, estrategia 3 de igualdad de oportunidades y no discriminación contra las mujeres. Con este Código de Ética se espera que la comunidad tecnológica realice sus funciones públicas, y los Lineamientos generales para propiciar la integridad de los servidores públicos y para implementar acciones permanentes que favorezcan su comportamiento ético, a través de los Comités de Ética y de Prevención de Conflictos de Interés, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de agosto de 2015; el presente Código tiene por objeto

establecer las normas que regirán la conducta de los servidores públicos federales que integran al Tecnológico Nacional de México (TecNM, 2020b).

Instalaciones del Instituto Tecnológico de Boca del Río

En la página oficial del Instituto Tecnológico de Boca del Río se menciona que el principal propósito del campus es <<ofrecer oportunidades y herramientas para que todos los jóvenes desarrollen al máximo su potencial de acuerdo con su conocimiento, sus intereses y capacidades>>. Para el cumplimiento de lo anterior, el campus Boca del Río cuenta con una extensión de terreno de casi 5.5 hectáreas, en donde se incluyen:

- Laboratorios de química, biología, microbiología, alimentos, ingeniería civil, central de pruebas no destructivas en ambientes marinos, de investigación de recursos acuáticos, de peces y crustáceos, de alimento vivo, de investigación de acuicultura aplicada.
- Talleres de soldadura, de alimentos, de mecánica, de acuicultura, de embarcaciones menores.
- Cámara hiperbárica y área de mejoramiento genético
- Servicios y áreas: aulas climatizadas, internet inalámbrico, cafetería, áreas verdes, Centro de Información y Coordinación de Lenguas Extranjeras, sala de usos múltiples, sala audiovisual, centro de cómputo, instalaciones deportivas, servicio médico, Becas Federales CONACYT (entre otras), bolsa de trabajo, viajes de prácticas, además de programas de Servicio Social y Residencias (TecNM, 2020a).

Las funciones de cada apartado del organigrama son las siguientes:

Dirección

El(la) titular de este puesto es responsable de organizar, planear, coordinar, controlar, ejecutar y evaluar la prestación de los servicios educativos que ofrece el Instituto Tecnológico Superior de Boca del Río, conforme a los objetivos de la educación superior tecnológica y lineamientos y objetivos establecidos en el Decreto de Creación y del Estatuto Interior del Instituto (TecNM, 2020c).

Subdirección Académica

El (la) titular de este puesto es responsable de administrar la prestación de los servicios educativos que ofrece su área, conforme a los objetivos estratégicos de la educación superior tecnológica y de acuerdo a los lineamientos establecidos por la Dirección General de Institutos Tecnológicos (TecNM, 2020c).

Departamento de Ciencias del Mar

El (la) titular de este puesto es responsable de la formación académica, el desarrollo de las competencias académicas generales, la capacitación docente y la actualización disciplinaria del personal docente del Instituto, en relación a la estructura organizacional del departamento en donde se presta el servicio de residencia (TecNM, 2020c).

Problemas a resolver

Existe escasa documentación científica sobre las algas que se encuentran dentro del Golfo de México, que permitan identificar sus beneficios alimenticios, farmacéuticos o cosméticos.

En las playas de Boca del Río coexisten algas marinas de distintas especies, las cuales no presentan estudios que permitan comparar sobre los beneficios para salud humana que estas podrían tener, como su actividad antioxidante o capacidad antimicrobiana.

Por tanto, es importante investigar de manera comparativa las algas presentes en las costas de Boca del Río, Veracruz, con el fin de determinar la presencia de compuestos bioactivos en ellas, y que de alguna manera logren aportar un beneficio para la salud humana desde diversas perspectivas y así aprovechar sus potencialidades a este respecto.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar dos métodos de extracción de polifenoles con capacidad antimicrobiana en algas marinas de Boca del Río.

Objetivos específicos

1. Evaluar el método de extracción por Soxhlet, así como el método de extracción por maceración.
2. Extraer compuestos polifenólicos en tres especies de algas: verde (*Ulva lactuca*) y rojas (*Gracilaria mammalis* y *Gracilaria bursa-pastoris*).
3. Determinar el contenido de polifenoles totales con capacidad antimicrobiana en algas recolectadas de playa Pelicano en Boca del Río.
4. Establecer qué condiciones son mejores para la extracción de compuestos polifenólicos algales.

Justificación

Con la finalidad de obtener productos a partir de extractos polifenólicos con actividad antimicrobiana, este proyecto se justifica ante la necesidad de generar nuevos productos para el combate de enfermedades infecciosas causadas por bacterias, ya que la resistencia a los antibióticos es un problema de carácter mundial y cada día más latente en nuestro país. También haciendo parte al estudio de los extractos polifenólicos obtenidos y la influencia de diferentes variables de operación sobre el proceso de extracción de los polifenoles.

Marco teórico

Compuestos bioactivos en algas marinas

Los compuestos bioactivos son componentes químicos presentes en pequeñas cantidades en diversas fuentes naturales, que tienen una actividad biológica dentro del organismo, lo que se traduce en beneficios para la salud humana (Consuegra-Valenzuela, 2014).

Pueden ser de origen animal o vegetal y se encuentran en alimentos como frutas, verduras, carnes, pescados, huevos, lácteos entre otros. En el caso de las algas, las condiciones ambientales a las que están expuestas inducen la producción de compuestos únicos que resisten el estrés oxidativo (Cuesta *et al.*, 2016).

Los compuestos bioactivos de las algas tienen diversas actividades biológicas, como la protección a la radiación UV, anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes, etc. Además, estos compuestos pueden afectar la expresión de los genes (Quitral *et al.*, 2012).

Compuestos polifenólicos

De manera general, los extractos de macroalgas son ricos en compuestos polifenólicos de los cuales existen diversas investigaciones sobre sus diferentes propiedades.

Los compuestos polifenólicos se tratan de compuestos monoméricos, oligoméricos o poliméricos con un anillo aromático unido a uno o más sustituyentes hidroxil e incluye en este grupo fenoles simples, cumarinas, flavonoides, estilbenos, lignanos, taninos hidrolizables, condensados y

florotaninos. Un estudio sobre la macroalga parda *Lessonia trabeculata* hecho por Apumayta-Suárez (2019) demostró que el contenido de polifenoles totales en dicha alga fue alto, un total de 128.2 mgEAG/100 g de alga seca y molida.

Por su parte, Ortiz (2011) realizó un estudio de la concentración de polifenoles en el alga *Ulva lactuca* teniendo presentes en extracto etanólico 138 mgEAG/L, 29.22 mgEAG/100 g de alga fresca y 146.11 mgEAG/100 g de alga seca. Estableciendo concentraciones considerables de polifenoles, expresado en mgEAG/L, para los extractos etanólicos del alga.

Por otro lado, Elasri *et al.* (2017) demostraron que la macroalga *Gracilaria bursa-pastoris* presentaba un alto contenido fenólico total 142.6 mg GAE/g de extracto para extracto etanólico.

Factores que afectan la concentración de polifenoles

Algunos polifenoles son sensibles a tratamientos térmicos, ya que el calor excesivo altera los pigmentos presentes en las muestras vegetales.

Luna *et al.* (2016) Evaluaron a diferentes condiciones de temperatura (63 °C, 70 °C y 75 °C) y pH (3, 3.5 y 4) su efecto sobre el contenido final de polifenoles, demostrando que las condiciones que afectan más significativamente la destrucción de polifenoles son a temperatura de 75 °C y pH 4.

Los polifenoles, que son compuestos aromáticos y contienen el núcleo de benceno, son susceptibles a la luz y, por lo tanto, se degradan fácilmente. Por esta razón, es esencial manejar con cuidado durante la extracción y almacenamiento de los extractos obtenidos para preservar su actividad biológica. Además, es importante evaluar los métodos de almacenamiento para su

aplicación en la industria alimentaria o farmacéutica. Las condiciones de iluminación pueden influir en la concentración de polifenoles, lo que puede resultar en una disminución de su actividad antioxidante. Por otro lado, el contenido de polifenoles puede variar dependiendo del grado de madurez del alga (Vicente *et al.*, 2017).

Métodos de extracción convencionales.

La extracción eficiente de polifenoles es esencial para poder obtener extractos con potencial aplicación farmacéutica, cosméticas o alimentaria. El aislamiento e identificación de compuestos fenólicos dependen en gran medida del proceso de extracción. Factores como el tipo de disolvente, la preparación y naturaleza del material a extraer, la estructura química de los compuestos fenólicos, la temperatura, el tiempo de extracción, la relación sólido-líquido, el método de extracción utilizado y la presencia potencial de sustancias que puedan interferir, juegan un papel crucial en la eficacia de la extracción (Bucić-Kojić *et al.*, 2011).

Extracción por el método Soxhlet

La técnica de extracción por Soxhlet, ha sido el método estándar para la extracción de muestras sólidas desde su invención en el siglo pasado, sigue siendo el principal punto de referencia para comparar otros métodos de extracción (Jensen, 2007).

Este procedimiento se lleva a cabo en un aparato llamado Soxhlet. El proceso comienza con una muestra que ha sido previamente triturada y luego colocada dentro de un cartucho en forma de dedal hecho de celulosa, que se sitúa en el

sifón del aparato. A continuación, se calienta el disolvente, que está en el balón del equipo, y sus vapores se condensan y caen gota a gota sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo así los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, ahora con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al balón de ebullición. Este ciclo se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra, que quedan concentrados en el disolvente (Pérez *et al.*, 2009).

Existen factores que influyen en el método de extracción Soxhlet incluyen el tamaño de las partículas sólidas, el tipo de solvente utilizado, la temperatura y la agitación durante el proceso. Estos elementos determinan la interacción entre el soluto y la combinación de solvente. Al mantener estas variables bajo control, se puede lograr una extracción sólido-líquido eficiente (Ibarra-Ibarra, 2022).

Extracción por el método de maceración

La maceración es un método que consiste en sumergir la muestra a macerar en un solvente y dejarlo una determinada cantidad de tiempo, para así transmitir al líquido características del producto macerado. Es la forma más sencilla de preparar extractos, y puede realizarse de manera repetida, para conseguir un mayor agotamiento de las sustancias solubles contenidas en la muestra. Alguna desventaja es su prolongado tiempo, que en algunas ocasiones es de días o semanas. Por otro lado, el proceso de maceración se ve favorecido por la agitación, ya que esta contribuye a la extracción de dos maneras: potenciando la difusión y retirando la solución concentrada que se encuentra en la superficie de

la muestra. Este método ha sido empleado desde tiempos antiguos para la obtención de aceites esenciales y compuestos bioactivos (Azmir *et al.*, 2013).

Un estudio hecho por Nada *et al.* (2016) utilizaron el método de maceración para la extracción de polifenoles secos de chokeberry (*Aronia melanocarpa*) con etanol al 50 %, en una relación solido-liquido de 1:20, obteniendo el resultado de fenoles totales de 27.8 mg GAE/g. indicaron que la técnica de maceración es eficaz y sencilla para la extracción de compuestos bioactivos, también señalaron que para este caso el tiempo de maceración no fue relevante para la extracción de polifenoles.

Métodos de extracción no convencionales

Los métodos no convencionales han sido de interés científico debido a los altos rendimientos para la extracción de compuestos bioactivos. Ya que requieren menor tiempo de extracción, por otro lado, impactan notablemente en la disminución de la contaminación al medio ambiente, por sus bajos consumos de disolventes orgánicos y de gasto energético (Wong-Paz *et al.*, 2020).

Extracción Asistida por Ultrasonido

La extracción asistida por ultrasonido, es un método eficaz para el proceso de extracción y la calidad del producto final, reduce el tiempo de extracción y el consumo de energía (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2020).

Un estudio realizó una investigación aplicando la ultrasonicación como herramienta para intensificar una eficiencia mejorada en los procesos de extracción de *d*-Limoneno. Demostraron que el uso de EAU redujo el tiempo total

de extracción a 20 min. frente a los 185 min. de un proceso convencional, obteniendo un rendimiento de extracción de 32.9 mg/g, 97% de extracto de *d*-Limoneno (Khandare *et al.*, 2021).

Determinación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu es un ensayo espectrofotométrico utilizado para determinar el contenido de compuestos polifenólicos. El método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, que produce una coloración azul que puede ser medida espectrofotométricamente a 765 nm. La cantidad de compuestos fenólicos se cuantifica a partir de la construcción de una recta patrón de ácido gálico, el método de Folin-Ciocalteu es uno de los métodos más utilizados para la determinación de compuestos fenólicos (Lacueva *et al.*, 2010).

El reactivo Folin-Ciocalteu es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. En un medio ácido, las dos sales forman el ácido fosfomolibdotúngstico, que es de color amarillo. Cuando los grupos fenólicos reducen el ácido fosfomolibdotúngstico, se forma un complejo de color azul intenso. La intensidad de este color es lo que se mide para evaluar el contenido en polifenoles. Debido a que el mecanismo de reacción es una reacción redox, el método Folin-Ciocalteu también puede considerarse como un método de medida de la actividad antioxidante total. Es un método preciso y sensible el cual puede sufrir variaciones en los volúmenes de muestra analizada, concentración de reactivos y tiempo de reacción (García-Martínez *et al.*, 2015).

Portari-Mancini *et al.* (2018) utilizaron el método de Folin-Ciocalteu para determinar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en *Halimeda monile*, *Halimeda opuntia* y *Halimeda incrassata*. Los extractos acuosos demostraron un contenido total de compuestos polifenólicos de 5.07, 4.39 y 9.11 mg de GAE/g de alga seca, respectivamente.

Actividad antimicrobiana en algas

Se ha descubierto recientemente que las macroalgas marinas representan una alternativa prometedora a los medicamentos comerciales debido a sus propiedades antimicrobianas. Esto abre una nueva posibilidad para la producción de nuevos medicamentos en la industria farmacéutica. Existe una amplia diversidad de familias y grupos de antimicrobianos de interés clínico (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

Las algas marinas se consideran una fuente rica de metabolitos secundarios con estructuras y funciones muy diversas, muchas especies han mostrado tener sustancias con efectos antimicrobianos, en especial bactericidas o bacteriostáticos, cuyas estructuras corresponden a ciertos tipos de aminoácidos, terpenoides, florotaninos, ácido acrílico, compuestos fenólicos, esteroides, cetonas y alcanos halogenados, así como polisulfuros cíclicos y ácidos grasos (Muñoz *et al.*, 2020).

La gran variedad de las algas marinas hace que se conviertan en una fuente potencial de fármacos y un gran campo de investigación en diversas áreas biomédicas (Taskin *et al.*, 2010).

El potencial antibacteriano de las algas se debe a su capacidad para sintetizar, entre otros, a los diterpenos de las algas verdes, terpenos halogenados en algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpeno-aromático en algas pardas (Razarinah *et al.*, 2018).

Determinación de actividad antimicrobiana

Muñoz *et al.* (2020) Evaluaron las actividades antimicrobianas de extractos etanólicos y hexánicos de nueve especies de macroalgas marinas recolectadas en la playa de San Francisco, Ancon de Lima Perú. Su evaluación fue de manera *in vitro* frente a bacterias estándar Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*). Sus resultados demostraron que los extractos etanólicos tuvieron un mayor rendimiento de 67% en comparación con los hexánicos de 33%, especialmente frente a las bacterias Gram positivas, siendo el extracto obtenido de *Ulva intestinalis* y *Ulva nematoidea* los más activos frente a *S. aureus* con 74.1% y 78.2% de inhibición, respectivamente.

Por su parte, los extractos etanólicos de *U. enteromorpha* y *Cladophora sp* frente a *S. typhimurium* presentaron solo 40% de inhibición. El extracto etanólico de *Cladophora sp.* presentó actividad antimicrobiana frente a las cinco cepas bacterianas. Los autores demostraron que la mayoría de las algas estudiadas con extractos etanólicos y hexánicos son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas.

De igual manera un estudio realizado en Malasia por Razarinah *et al.* (2018) utilizaron extracto de algas verdes de *Halimeda sp.* Se extrajeron usando metanol y evaluaron su actividad antimicrobiana contra patógenos microbianos de bacterias Gram positivas (*B. subtilis*, *S. aureus* y *B. cereus*), bacterias Gram negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*), levadura (*C. albicans*) y moho (*A. niger*). Por el método de difusión en placa, demostrando que *Halimeda sp.* inhibió el crecimiento de *B. subtilis*, *S. aureus* y *B. cereus*. La zona de inhibición más alta contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *B. cereus* se registró a concentraciones de 350 mg/ml con 13.67 ± 0.58 mm, 12.00 ± 0.00 mm y 9.67 ± 0.58 mm, demostrando una actividad antimicrobiana prometedora.

Actividad antioxidante en algas

En los mares tropicales, las algas marinas se encuentran expuestas a una alta cantidad de luz solar la cual puede conducir a la formación de radicales libres, de manera que la ausencia de daños oxidativos en sus componentes estructurales y fisiológicos sugieren que estos organismos presenten un eficiente sistema de defensas antioxidantes (Vidal *et al.*, 2009).

La capacidad antioxidante de un extracto vegetal, incluyendo las algas marinas, se debe a la presencia de una variedad de compuestos químicos. Las algas marinas pueden contener compuestos apolares, como los derivados clorofílicos, terpenoides y carotenoides. Algunas especies de algas poseen aminoácidos tipo micosporinas, que tienen la capacidad de absorber cantidades significativas de radiación UV, evitando así el daño peroxidativo. Además, las vitaminas liposolubles como la vitamina E y las vitaminas hidrosolubles como la vitamina C,

que tienen actividad antioxidante, también podrían contribuir a las propiedades antioxidantes de estos organismos (Batista-González *et al.*, 2009).

También, las algas se distinguen de las plantas terrestres por la presencia de compuestos polisacáridos y compuestos simples sulfatados, así como florotaninos y bromofenoles, algunos de los cuales poseen propiedades antioxidantes (Batista-González *et al.*, 2009).

Los antioxidantes son compuestos de gran interés actualmente por sus beneficios que aportan a la salud humana. Es por ello que las algas marinas son uno de los recursos potenciales de dichos compuestos, como, los compuestos fenólicos que tienen una gran capacidad antioxidante, considerada de gran importancia biológica para el efecto preventivo de sobre algunas enfermedades cardiovasculares e inmunológicas. La finalidad de estos compuestos reside en la capacidad para captar los radicales libres que se pueden generar en las células del cuerpo humano y que son resultado de la combinación de muchos factores ambientales incluida la contaminación atmosférica (Echeverría *et al.*, 2009).

Determinación de actividad antioxidante

Echeverría *et al.* (2009). Analizaron los extractos metanólico y hexánico de cinco macroalgas, *Caulerpa mexicana*, *Laurencia sp.*, *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.* y *Sargassum cymosum*. Midieron su actividad antioxidante mediante el método DPPH de los respectivos extractos. Los resultados que obtuvieron demostraron que los extractos de las macroalgas *Sargassum sp.*, *Dictyota sp.*, *Sargassum cymosum* y *Laurencia sp.* presentaron una alta actividad antioxidante. El extracto del alga *Sargassum cymosum* demostró tener el mejor desempeño en términos

de extracción, contenido de compuestos fenólicos y actividad inhibidora del radical DPPH.

Elasri *et al.* (2017) Evaluaron el potencial antioxidante de los extractos metanólicos y acuosos de *Gracilaria bursa-pastoris* midiendo la actividad eliminadora de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y el contenido total de compuestos fenólicos, flavonoides y flavonoles en cada extracto. El estudio demostró que todos los extractos obtuvieron una actividad eliminadora de radicales DPPH, y los extractos metanólicos demostraron un gran potencial antioxidante con un valor muy bajo de CE50 (0.085 mg/mL), significativamente equivalente a la CE50 (0.028 mg/mL) del ácido ascórbico antioxidante comercial. Demostrando que las macroalgas tienen un gran potencial antioxidante que podría considerarse para futuras aplicaciones en medicina, producción de alimentos o industria cosmética.

Álvarez-Gómez *et al.* (2016) En su estudio determinaron la capacidad antioxidante de diversos extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos de algas marinas rojas y verdes, mediante el método ABTS, que trata de la decoloración del radical ABTS⁺, debido a su reducción a ABTS por la acción de antioxidantes. Siendo el radical catiónico ABTS⁺ un cromóforo verde azulado que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil benztiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical ABTS⁺ se determina en función a la concentración.

Los autores en su estudio concluyeron que, entre los solventes de extracción, el mayor rendimiento de extracción se presentó en los solventes H₂O y MeOH 20%

(v/v). Y encontraron que la mayor actividad antioxidante se obtuvo en los extractos de las macroalgas rojas *Hydropuntia cornea*, *Gracilariopsis longissima*, *Halopithys incurva* y *Porphyra umbilicalis*, mientras que la actividad más baja se detectó en los extractos de la macroalga verde *Ulva rotundata*. Siendo el método ABTS una prueba sencilla y rápida proporcionando una visión completa del extracto en su conjunto, ya que en esta metodología evaluaron los componentes que se encuentran tanto en el medio lipofílico como el medio hidrofílico.

Por otro lado, las algas verdes (*Codium decorticatum*, *Enteromorpha intestinalis*, *Ulva fasciata* y *Chaetomorpha anteninna*) han demostrado una potenciada actividad para inhibir la peroxidación del ácido linoleico. Las especies que demostraron ser más eficaces en la peroxidación lipídica fueron *E. intestinalis* y *Chaetomorpha anateninna*, logrando una inhibición de más del 70% (Shalaby, 2011).

Procedimiento y descripción de las actividades realizadas

Colecta y pretratamiento

Se recolectaron tres tipos de algas: *Ulva lactuca*, *Gracilaria bursa-pastoris* y *Gracilaria mammalis* en la playa Pelicano de Boca del Río, Veracruz (Fig. 1). Tras su recolección, se trasladaron al laboratorio para su pretratamiento. Este consistió en separar las algas por especie, lavarlas, eliminar los epifitos presentes y determinar su peso en estado húmedo (Fig. 2 y 3).



Figura 1. Recolecta de algas en playa pelicano.



Figura 2. Algas lavadas y sin epifitos presentes en ellas.



Figura 3. Determinación del peso húmedo.

Después, las muestras se sometieron a un proceso de secado en horno a 60°C durante un período de 24 a 48 horas (Fig. 4). Una vez secas, se pulverizaron (Fig. 5). Al finalizar este proceso, se determinó el peso seco de las muestras (Tabla 1).



Figura 4. Algas en horno de secado a 60°C .



Figura 5. Pulverización y tamizado de las muestras sólidas.

Tabla 1. Comparación de peso húmedo y peso seco de cada especie.

Muestra	Peso húmedo (g)	Peso seco (g)
<i>Ulva lactuca</i>	279.5	50.2
<i>G. bursa-pastoris</i>	429.6	48.6
<i>G. mammalis</i>	620.9	65.3

Finalmente, las muestras pulverizadas se almacenaron en recipientes debidamente etiquetados, en un lugar oscuro y seco para su conservación (Fig. 6).



Figura 6. Muestras sólidas conservadas en pomos etiquetados.

Extracción de polifenoles por el método Soxhlet

Para el proceso de extracción por Soxhlet, se pesaron 3.0 g de cada muestra de alga sólida en dedales de celulosa que luego se colocaron en la columna de extracción (Fig. 7). Posteriormente, se llenó el matraz de fondo plano con el solvente hasta aproximadamente la mitad. En este paso es importante que se tome en cuenta que el matraz no quede sin solvente a medida que este asciende, ya que la muestra podría secarse o incluso quemarse debido a la pérdida de solvente por evaporación durante la extracción.



Figura 7. Llenado de matraz de fondo plano con el solvente etanol al 96%.

Calentamiento

La temperatura tiene un impacto significativo en los solventes, y este depende de su punto de ebullición. Por lo tanto, se debe conocer la sustancia con la que se está trabajando. Para optimizar la operación, es ideal mantener la temperatura óptima para asegurar la extracción de la sustancia deseada. En este caso, se utilizó etanol al 96%, cuyo punto de ebullición es de 78°C (Fig. 8).



Figura 8. Calentamiento del solvente.

Refrigeración

El funcionamiento eficiente del sistema de refrigeración depende de la correcta conexión de las mangueras. Si no se conectan correctamente a la entrada y salida de agua en el equipo, el sistema puede sobrecalentarse (Fig. 9).



Figura 9. Conexión de las mangueras de entrada y salida del equipo.

Proceso de Extracción

Con el equipo Soxhlet ya ensamblado, se activó la mantilla de calentamiento para dar inicio al proceso. Cuando el solvente alcanzó su punto de ebullición, empezó a evaporarse debido al calentamiento de las paredes del equipo.

El refrigerante se condensó y comenzó a caer en forma de gotas sobre el dedal de celulosa que contenía la muestra sólida, completando así el primer ciclo.

A medida que el condensado caía sobre el cartucho, este empezaba a escurrir llenando el recipiente de extracción hasta llegar al nivel de la bajada del sifón, retornando con todo el material disuelto hacia el matraz de fondo plano (Fig. 10).



Figura 10. Instalación completa del equipo Soxhlet.

Final de la extracción

Al concluir el proceso de extracción, se dejó el sistema reposar durante unos minutos para que se enfriara y poder manipulado con mayor facilidad. Una vez que alcanzó la temperatura ambiente, se desmontó el equipo y se extrajo el cartucho que se encontraba saturado de solvente, para posteriormente pasar todos los cartuchos utilizados al horno de secado.

Finalmente, la muestra líquida se almacenó en frascos herméticamente cerrados, los cuales se etiquetaron y se envolvieron con papel estraza para proteger las muestras de la luz (Fig. 11 y 12). Este proceso de extracción duró una hora y media, con 8 ciclos para cada muestra. Cada muestra se realizó por duplicado.



Figura 11. Muestras extraídas de las algas.



Figura 12. Muestras en frascos cerrados herméticamente.

Extracción por maceración

Para el procedimiento de extracción por maceración, se mezclaron 2.5 g de muestra sólida de cada una de las tres especies de algas con 37.5 mL de etanol en una relación sólido-líquido de 1:15. Esta mezcla se colocó en tubos de centrifuga de 50 mL, realizándose dos muestras por cada especie. Posteriormente, las seis muestras se situaron en un agitador a 150 rpm (Fig. 13).



Figura 13. Muestras en agitador a 150 rpm.

En este paso se realizó una cinética de extracción para poder determinar en cuanto tiempo se hacía la mayor extracción de polifenoles. De tal modo que se extrajeron 500 μ L de muestra en los primeros 15 minutos para su posterior lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 765 nm, después a los 30, 45, 60 y 90 minutos, hasta completar una hora y media (Fig. 14). Con los datos obtenidos de las absorbancias se elaboró una cinética de extracción que se muestra en el apartado de resultados en la gráfica de la figura 33, para de esta forma poder darnos una idea de la concentración versus el tiempo de extracción.

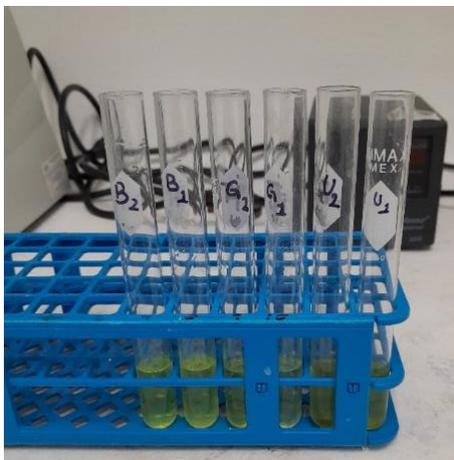


Figura 14. Muestras tomadas cada 15 y 30 minutos.

En la siguiente fase, se mezclaron de igual forma 2.5 g de cada muestra sólida con 37.5 mL de etanol en tubos de centrifuga de 50 mL (Fig.15), pero en esta ocasión se agregó un periodo de 10 minutos con el método de sonicación para poder demostrar si agregando este método se potencializaba la extracción de polifenoles. Esto se realizó por triplicado.



Figura 15. Muestras maceradas en tubos de 50 mL.

Los tubos con las muestras se rotularon con los periodos de maceración y sonicación correspondientes, las primeras tres muestras se maceraron durante 45 minutos, las siguientes tres muestras se sometieron a sonicación durante 10 minutos seguido de maceración durante 35 minutos y para las tres últimas

muestras se hizo el segundo paso dos veces (Fig. 16). Por ultimo Las muestras se agregaron a tubos de 15 mL para su posterior determinación de polifenoles totales.



Figura 16. Muestras en sonicador.

Método Folin-Ciocalteu para determinación de polifenoles totales

Inicialmente para calcular la cantidad de polifenoles totales en cada muestra, se creó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. Esta curva sirvió como referencia para comparar los datos obtenidos posteriormente. La ecuación resultante de esta curva fue esencial para determinar la cantidad de polifenoles en las muestras extraídas. Se calcularon las diluciones necesarias para la curva de calibración de ácido gálico, partiendo de diferentes concentraciones de una solución madre de 200 mg/L. Se pesaron 200 mg de ácido gálico en una balanza analítica y se llevó a volumen con etanol al 96% en un matraz volumétrico.

A partir de esta solución patrón, se prepararon soluciones con diferentes concentraciones: 30, 40, 70, 90 y 100 mg/L. Esto permitió obtener los datos de

absorbancia necesarios para construir la curva de calibración. En la tabla 2. Se muestran las alícuotas tomadas respectivamente de la solución madre y etanol.

Tabla 2. Alícuotas con diferentes concentraciones de la solución madre de ácido gálico.

mg/L	Solución madre mL	Etanol 96% mL
30	150	850
40	200	800
70	350	650
90	450	550
100	500	500

Para preparar la solución de carbonato de sodio al 2.5%, se pesaron 0.0250 g de carbonato de sodio y se diluyeron en 100 ml de agua desionizada. Se agitó la solución durante dos minutos hasta que el carbonato de sodio se disolvió completamente.

Pasado los 15 minutos de haber metido las alícuotas en el baño termostato se midió la absorbancia a 765 nm usando UV-VIS espectrofotómetro (Fig. 17). Con los datos arrojados se procedió a construir la curva de calibración que se muestra en la gráfica de la figura 18.



Figura 17. Alícuotas preparadas de la solución madre de ácido gálico.

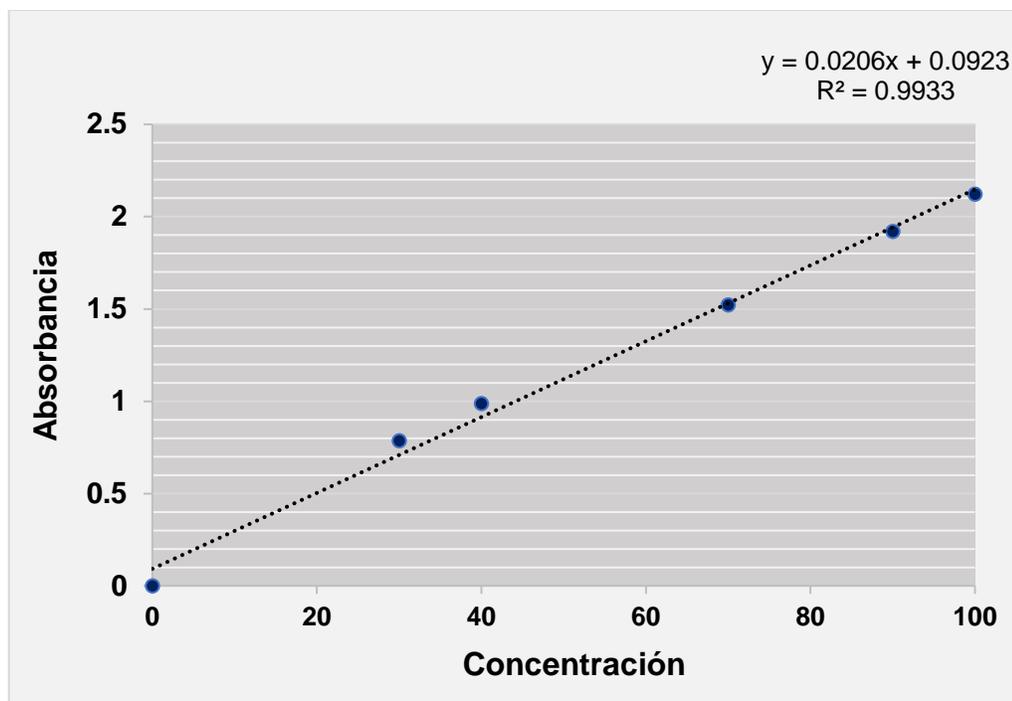


Figura 18. Curva de calibración estándar de ácido gálico.

Concentración de polifenoles en las muestras extraídas

En tubos de ensayo se agregaron 500 μL de cada una de las muestras extraídas con los métodos utilizados, adicionando al igual que para la curva patrón 250 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (2N), 2.25 mL de etanol al 96% y 2 mL de carbonato de sodio al 2.5%.

Las muestras pasaron a incubarse a 45°C en baño termostato durante 15 minutos (Fig. 19). Finalmente se leyeron las absorbancias en espectrofotómetro a 765 nm. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico sobre litro (mgEAG/L).



Figura 19. Muestras en baño termostato a 45°C por 15 min.

Determinación de actividad antioxidante por el método ABTS

Inicialmente, se realizó una dilución 1:24 de ABTS en un matraz de 100 mL, añadiendo 80.5 mL de etanol al 96% y 3.5 mL de ABTS. Durante el análisis, en tubos de ensayo se combinaron 2.850 mL de ABTS con 150 μ L de cada una de las muestras extraídas.

Se registró la absorbancia inicial en espectrofotómetro a 734 nm, buscando que la lectura inicial estuviera lo más cerca posible de 0.700 nm. Luego, las muestras se dejaron reaccionar durante 6 minutos antes de obtener las absorbancias finales. Con estos datos, se pudo calcular el porcentaje de inhibición de los polifenoles presentes en las muestras, utilizando la siguiente fórmula.

$$\%Inhibición = \left[\frac{ABS_{inicial} - ABS_{final}}{ABS_{inicial}} \right] \times 100$$

Resultados

En este apartado se muestran los resultados correspondientes a la cinética de extracción, la evaluación de los métodos utilizado para la extracción de polifenoles, así como las concentraciones de polifenoles totales en extractos etanólicos de las tres especies de algas (*Ulva lactuca*, *Gracilaria mammalis* y *Gracilaria bursa-pastoris*) y la actividad antioxidante de cada una de ellas.

De acuerdo a la gráfica de la figura 24, la cinética de extracción demostró, el tiempo de extracción con relación al promedio de las absorbancias de cada una de las muestras de las tres especies de alga.

Se observa el pico de la curva que representa el tiempo en el cual existe una mayor absorbancia. Siendo a los 45 minutos el tiempo donde se determinó la máxima extracción para cada una de las muestras.

Ulva lactuca obtuvo una mayor absorbancia al resto de las especies con un promedio de 0.119, seguida de *G. mammalis* con un promedio de 0.103 y para *G. bursa-pastoris* un promedio de 0.079 de absorbancia.

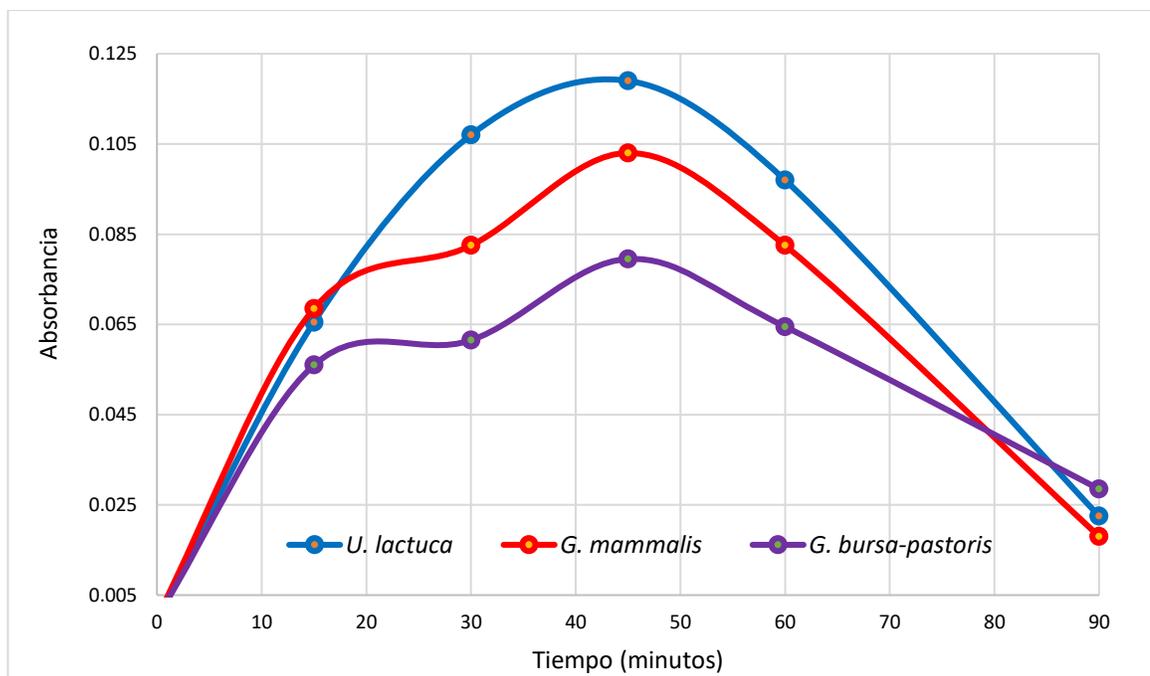


Figura 20. Cinética de extracción correspondiente al método de maceración.

Se aplicó el análisis estadístico ANOVA con prueba Tukey para poder evaluar los métodos de extracción que se utilizaron.

En la literatura citada el estudio realizado por Ortiz, (2011) demostró que *Ulva lactuca* tuvo una concentración de polifenoles totales de 138 mgEAG/L de extracto etanólico. De acuerdo a esto, en los resultados obtenidos en el experimento del presente trabajo *U. lactuca* tuvo concentraciones de 3.3 mgEAG/L para el método Soxhlet, 8.80 mgEAG/L para maceración, 8.43 mgEAG/L y 9.32 mgEAG/L potencializando el método de maceración con sonicación, por otro lado, los resultados de los estudios de la alga *G. bursa-pastoris* hechos por Elasri, *et al.* (2017) tuvieron una concentración de 142.6 mgEAG/g de muestra sólida para extractos etanólicos, comparado con los resultados del presente trabajo *G. bursa-pastoris* tuvo concentraciones de 2.33,

2.78, 2.65 y 3.17 mgEAG/L y para la especie de alga roja *G. mammalis* se determinaron concentraciones de 2.84, 3.35, 2.99 y 3.62 mgEAG/L respectivamente por los métodos mencionados anteriormente, mostrados en la gráfica de la figura 21.

Obteniendo concentraciones de polifenoles totales considerablemente bajas en comparación con los estudios realizados en la literatura citada.

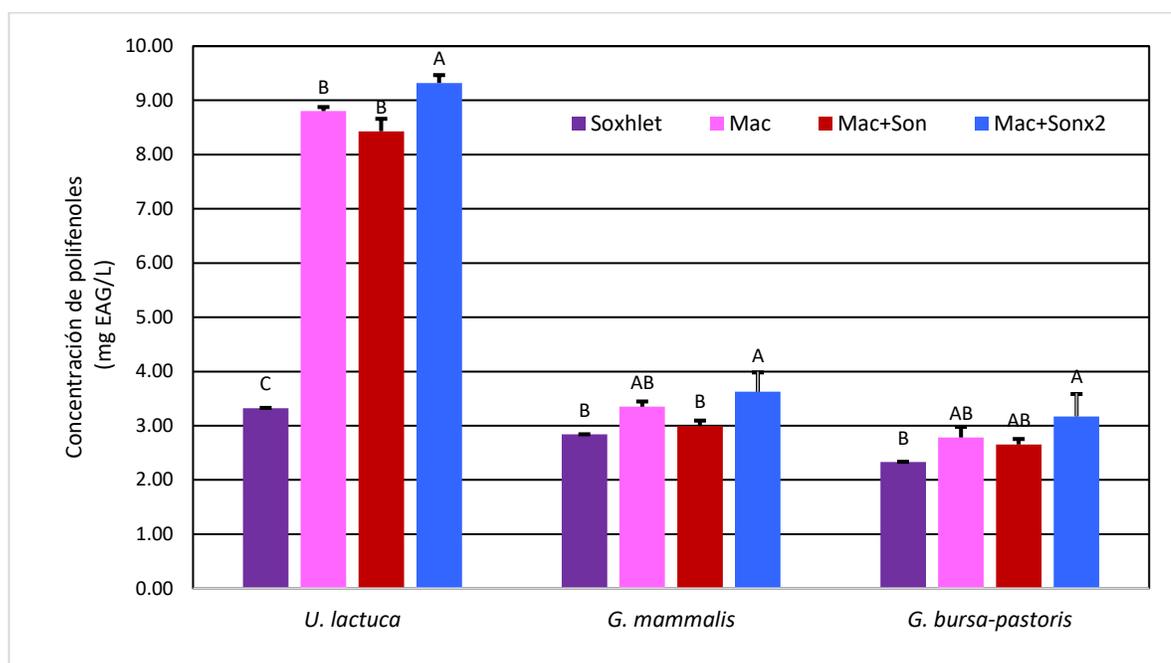


Figura 21. Concentración de polifenoles totales en (mgEAG/L) correspondiente a cada método de extracción.

Sin embargo, se puede observar que las mejores condiciones para la extracción de polifenoles son por el método de maceración y potencializando el método con sonicación se obtiene una mayor extracción y por lo tanto una mayor concentración de polifenoles totales en comparación con la extracción del método Soxhlet.

Para la determinación de la actividad antioxidante por el método de oxidación del radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) en la gráfica de la figura 22 se muestran los porcentajes de inhibición que obtuvieron las tres muestras por cada especie de alga, correspondiendo a *U. lactuca* un porcentaje de inhibición del 68.29%, *G. mammalis* 53.33% y *G. bursa-pastoris* 48.15%. A comparación de los estudios de Álvarez-Gómez *et al.* (2016) donde determinaron que la especie *Ulva rotundata* tuvo una actividad antioxidante más baja que el alga *Gracilaria longissima* y por otro lado el estudio realizado por Shalaby (2011) demostró que la especie *Ulva fasciata* logro tener una potenciada actividad antioxidante.

Lo que se considera que estas variaciones de resultados pueden deberse a diferentes variables, como la especie o el tipo de solvente que se utiliza durante la extracción de compuestos bioactivos para lograr determinar una alta actividad antioxidante.

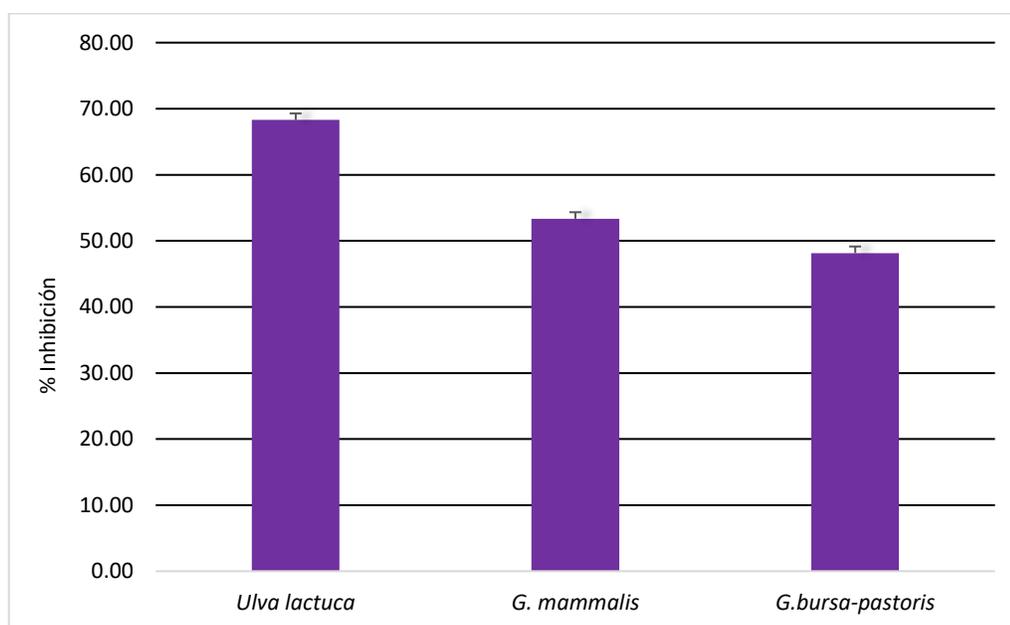


Figura 22. Porcentajes de inhibición para cada especie de alga.

Conclusiones y recomendaciones

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se demostró que los extractos etanólicos de las algas *Ulva lactuca*, *Gracilaria mammalis* y *Gracilaria bursa-pastoris* pueden ser una fuente natural significativa de antioxidantes.

La actividad antioxidante en las algas tiene que ver con la cantidad y naturaleza de los compuestos bioactivos presentes en sus extractos algales.

Siendo el extracto etanólico del alga *Ulva lactuca* que presentó porcentaje de inhibición relativamente alto de 68.29% y una mayor concentración de polifenoles totales de 9.38 mgEAG/L, mientras que las concentraciones más bajas estuvieron presentes en las algas *G. mammalis* y *G. bursa-pastoris* al igual que sus porcentajes de inhibición.

Con el objetivo de evaluar dos métodos de extracción de polifenoles en alga de Boca del Río, se determinó que existen diferencias significativas entre ambos métodos (Soxhlet y maceración), sin embargo, el método que proporciona una mejor extracción fue por maceración, que también al potencializarlo con la sonicación presentó una mejora en la extracción de polifenoles, lo que demuestra que aplicando un método no convencional a un método convencional se pueden obtener mejores resultados de extracción.

Se recomienda continuar con más estudios sobre las algas marinas dentro del Golfo de México donde se demuestre la importancia de este recurso natural y contribuir con su aprovechamiento sobre las funciones que pueden aportar un beneficio a la salud humana como, determinar la capacidad antimicrobiana que presenten estas algas y analizar otros factores que pueden intervenir en la

cantidad de polifenoles totales presentes en extractos algales ya que existen variables que pueden alterar estas concentraciones.

Competencias desarrolladas

- Uso del equipo Soxhlet.
- Uso de agitador.
- Manejo de espectrofotómetro.
- Uso de reactivo Folin-Ciocalteu.
- Determinación de polifenoles totales.
- Manejo de materiales y utilería de laboratorio.
- Manejo de sonicador.
- Manejo de baño termostatado.
- Determinación de actividad antioxidante en algas *Ulva lactuca*, *Gracilaria mammalis* y *Gracilaria bursa-pastoris*.

Experiencia profesional adquirida

Durante el desarrollo de este proyecto, se llevó a cabo trabajo practico en laboratorio, lo cual permitió adquirir mayor conocimiento y experiencia en el manejo de material y equipo.

Se aprendió sobre las diferentes actividades a emplear en un laboratorio, las normas y precauciones que se deben seguir, debido a que es un área donde se trabaja con diferentes materiales, reactivos, equipos, entre otros, que se deben manejar con mucha precaución. De igual manera se aprendió sobre métodos y técnicas que permiten determinar funciones importantes en recursos naturales.

Fuentes de información

- Álvarez Gómez, F., Korbee, N. Y Figueroa, L. (2016). Análisis de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en extractos macroalgales y liquénicos mediante la aplicación de diferentes solventes y métodos de evaluación. *Ciencias Marinas*. Vol. 42, (4), 271-288. <http://dx.doi.org/10.7773/cm.v42i4.2677>.
- Apumayta Suárez, E.V. (2019). Actividad antioxidante y determinación del contenido de fucoidano, compuestos fenólicos y flavonoides en extractos de macroalga parda *Lessonia trabeculata*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina]. Repositorio Institucional-Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N. Y Omar, A.K.M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials. *Journal of Food Engineering*. Vol. 117, (4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>.
- Batista González, A.E., Charles, M.B., Mancini-Filho, J. Y Vidal Novoa. (2009). Las algas como fuentes de fitofármacos antioxidantes. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 14, (2).
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Srecko, T. Y Jokic, S. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica L.*). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol. 61, (3), 195-199. DOI:[10.2478/v10222-011-0021-9](https://doi.org/10.2478/v10222-011-0021-9).
- Calvo, J. Y Martínez Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 27, (1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>.
- Consuegra Valenzuela, V.A. (2014). Extracción de antioxidantes polifenólicos desde macroalgas *Macrocystis pyrifera* y *Ulva rigida*. [Tesis de Ingeniería, Universidad de Chile]. Repositorio institucional-Universidad de Chile.
- Cuesta, R.G., González García, K.L., Valdés Iglesias, O., Hernández Rivera, Y. Y Acosta Suárez, Y. (2016). Algas marinas como fuente de compuestos bioactivos en beneficio de la salud humana. *Revista Biotecnia*. Volumen 18, (3), 20-27.
- Echeverría, Z.B., Franco, S.A. Y Martínez, M.A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*. Vol. 16, (1), 126-131.

- Elasri, O., Saidi, N., Elkhiafi, N., Taybi, F.A., Mostareh, M., Zaraali, O., Haloui, B. y Ramdani, M. (2017). Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. Chem. Biol. Technol. Agric. Vol. 4, (28). <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0110-z>.
- Lacueva, A.C., Medina Remon, A. Y Llorach, R., Urpi Sarda, M., Khan, N., Chiva Blanch, G., Zamora Ros, R., Rotches Ribalta, M. Y Larnuela Raventós, R. (2010). Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. En De la Rosa, L., Alvarez Parrilla, E., González Aguilar, E. (Eds). Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability. USA: Blackwell Publishinglowa. (pp. 53-88). DOI: [10.1002/9780813809397.ch2](https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch2).
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I. Y Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>.
- Hernández Rodríguez, S., Quiroz Reyes, C.N., Ramírez Ortiz, M.E., Ronquillo de Jesús, E. Y Aguilar Méndez, M.A. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de *Justicia spicigera* mediante la metodología de superficie de respuesta. revista especializada en ciencias químico-biológicas, vol. 23. Doi: [10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246](https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246).
- Ibarra Ibarra, S. (2022). Extracción de polifenoles presentes en la cáscara de papa mediante el método de extracción Soxhlet a nivel de laboratorio. [Tesis de Ingeniería, Universidad de América]. Repositorio Institucional-Universidad de América.
- Jensen, W.B. (2007). The Origin of the Soxhlet Extractor. Chemical Education. Vol. 84, (12). <https://doi.org/10.1021/ed084p1913>.
- Khandare, D.R., Tomke, D.P. Y Rathod, K.V. (2021). Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. Chemical Engineering and Processing - Process Intensification. Vol.159. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108181>.
- Luna, J.C., Barreto, J.A. Y Marín, Z.T. (2016). Desarrollo de un modelo matemático que permita predecir el cambio del contenido de polifenoles en una matriz alimentaria sometida a tratamientos térmicos con diferentes condiciones. Revista Alimentos Hoy, Vol. 24, (39).
- Muñoz A.R., Santome S. Y León Q.J. (2020). Actividad antimicrobiana de extractos hexámico y etanólico de macroalgas marinas de la Bahía de Ancón, Lima-Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. Vol. 31, (2). [http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17829](https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i2.17829).

- Nada Čujić, Katarina Šavikin, Teodora Janković, Dejan Pljevljakušić, Gordana Zdunić, Y Svetlana Ibrić. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. Food Chemistry. Vol.194, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>.
- Ortiz, V.J. (2011). Composición Nutricional y Funcional de las Algas Clorofíceas Chilenas: *Codium fragile* y *Ulva lactuca*. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net>.
- Pérez, C., González, L., Colón, A., Morello, C., Mujica, V. Y Martínez, A. (2009). Evaluación comparativa de los rendimientos obtenidos mediante el proceso de extracción en aceites vegetales a partir de semillas oleaginosas. Anales de la Universidad Metropolitana. Vol. 9, (12), 181-206.
- Portari Mancini, D.A., Silva, A.M., Batista González, A.E., Diaz Gutiérrez, D. Andrade Whartha, E.R. Y Ricardo Pinto, J. (2018). Efecto protector de fracciones hidrofílicas de algas marinas del género *Halimeda* contra el estrés oxidativo en células Vero insultadas con Fe[Cl.sub.3] en relación con su contenido de polifenoles. Revista Cubana de Ciencias Biológicas. Vol. 6 (2).
- Quitral, V.R., Morales, C.G., Sepúlveda, M.L. Y Schwartz, M.M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencial como ingrediente funcional. Revista Chilena de Nutrición. Vol. 39, (4), 196-200.
- Razarinah, W., Rizlan Ross, E.E., Farinna, N., Rahim, A., Syazana Faridon, B. Y Adzfa Radzun, K. (2018). Antimicrobial activity of marine green algae extract against microbial pathogens. Malaysian journal of Biochemistry & Molecular biology. Vol. 2. (2) 42-46.
- Shalaby, E.A. (2011). Algae as promising organisms for environment and health. Plant Signal Behav. Vol. 6 (9), 1338-1350. doi: [10.4161/psb.6.9.16779](https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16779).
- Taskin E., Caki Z. & Ozturk M. "Assessment of in vitro antitumoral and antimicrobial activities of marine algae harvested from the eastern Mediterranean Sea. (2010). African Journal of Biotechnology. Vol. 9, (27), 4272-4277.
- TecNM. (2020a). Nuestro Instituto Tecnológico de Boca del Río. <https://bdelrio.tecnm.mx/conocenos/campus.html>.
- TecNM. (2020b). Filosofía Institucional. <https://bdelrio.tecnm.mx/conocenos/filosofia.html>.
- TecNM. (2020c). Organigrama del Campus Boca del Río. <https://bdelrio.tecnm.mx/conocenos/organigrama.html>.

- Vidal, A., Silva de Andrade-Wartha, E.R., de Oliveira e Silva, A.M., Pava, N.R., Lima, A., Fallarero, A., Batista, A.E. Y Mancini-Filho, J. Actividad antioxidante y polifenoles de las algas marinas *Halimeda opuntia* y *Halimeda monile*. (2009) *Ars Pharm.* Vol. 50, (1). 24-31.
- Vicente, A.R., Concellón, A., Viña, S.Z., Lemoine, M.L., Rodoni, L., Zaro, M.J., Hasperue, J., Massolo, J.F., Ortiz, C.M., González Forte, L., Quinteros, N., Valerga, L., Darré, M., Ortiz Araque, L.C. Y Pintos, F. (2018). <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/72815/Resumen.pdf?sequence=1>.
- Wong Paz, J.E., Aguilar Zárate, P., Veana, F. Y Muñiz Márquez, D.B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 23, 1-11.