



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**



---

**Tema:** Evaluación de la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos  
obtenidos de *Scenedesmus* sp.

---

Informe final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Zulay Alejandra Abril Ibarra

**Tutor:** Lic. Danae Fernández Rivero, MsC

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre 2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

**Lic. Danae Fernández Rivero**

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizó la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la Modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 02 de agosto de 2022

---

**Lic. Danae Fernández Rivero**

**C.I.: 1757181209**

**TUTORA**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Zulay Alejandra Abril Ibarra, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

**Zulay Alejandra Abril Ibarra**

**C.I. 1850357060**

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos docentes calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Ambato, 31 de agosto de 2022

---

Presidente de tribunal

---

Dr. Orestes López

C.I. 1754784864

---

Dr. Mario García

C.I. 1103605471

## **DERECHOS DEL AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



---

**Zulay Alejandra Abril Ibarra**

**C.I. 1850357060**

## **AUTORA**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo se lo dedico a mis padres, que me han guiado toda mi vida, me han brindado el apoyo necesario para poder culminar todos los proyectos que me he propuesto y me han motivado a seguir siempre adelante.

A mis queridas hermanas, que siempre me apoyan en cualquier decisión que tome, que me animan a seguir adelante y me brindan un espacio de tranquilidad y relajación de ámbitos que pueden llegar a agotarme.

A mis abuelitos, que siempre han estado preocupados por mí, por cómo me va en mi diario vivir y cómo es el avance en la universidad, y por motivarme y apoyarme de diversas formas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por guiarme, protegerme y siempre brindarme grandes bendiciones que me han permitido llegar a esta etapa de mi vida.

Así también, quiero expresar mis más profundos agradecimientos a todas aquellas personas que han hecho posible terminar con este proyecto de investigación:

A mis padres que me apoyaron y motivaron para culminar este proyecto; y a mis hermanas, que siempre han estado a mi lado ayudándome en este trayecto.

A mi tutora, la Lic. Danae Fernández por su asesoramiento, predisposición y ayuda.

A mis amigos que han sido un gran apoyo en todos los buenos y malos momentos vividos en la universidad.

A todos, muchas gracias.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DEL AUTOR .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>CAPÍTULO I.-</b> .....	1
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1.1 Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.2 Moléculas bioactivas naturales .....	1
1.1.3 Microalgas .....	1
1.1.4 Potencial de las microalgas como fuente de agentes biológicamente activos .....	3
1.1.5 Principales metabolitos bioactivos microalgales .....	5
1.1.6 Producción de biomasa y extracción de compuestos bioactivos .....	6
1.1.7 Antioxidantes .....	9
1.1.7.1 Estrés oxidativo .....	9
1.1.7.2 Actividad antioxidante .....	9
1.1.7.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	10
1.1.8 Antiinflamatorios .....	10
1.1.8.1 Respuesta inflamatoria .....	10
1.1.8.2 Actividad Antiinflamatoria .....	11
1.1.8.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	12
1.2 Objetivos .....	13



1.2.1 Objetivo General.....	13
1.2.2 Objetivos Específicos .....	13
<b>CAPÍTULO II.-</b> .....	14
<b>METODOLOGÍA</b> .....	14
2.1 Materiales .....	14
2.1.1 Materiales de laboratorio .....	14
2.1.2 Equipos .....	15
Tabla 2 Equipos de laboratorio .....	15
2.1.3 Reactivos.....	15
2.1.4 Medio de cultivo .....	16
2.2 Métodos .....	16
2.2.1 Hipótesis .....	16
2.2.2 Variables .....	17
2.2.3 Sección experimental.....	17
2.2.3.1 Preparación del medio de cultivo.....	17
2.2.3.2 Siembra de la microalga en el medio preparado .....	17
2.2.3.3 Incubación de las microalgas .....	17
2.2.3.4 Resiembra en recipientes de 1 litro .....	18
2.2.3.5 Remoción del medio y secado de la biomasa.....	19
2.2.3.6 Extracción con diferentes disolventes .....	19
2.2.3.7 Determinación de fenoles totales .....	19
2.2.3.8 Determinación de flavonoides totales .....	20
2.2.3.9 Determinación de carotenoides totales.....	20
2.2.3.10 Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).....	21
2.2.3.11 Ensayo de desnaturalización de la albúmina.....	22
2.2.4 Análisis de datos .....	22

<b>CAPÍTULO III.-</b> .....	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	24
3.1 Análisis y discusión de los resultados .....	24
3.1.1 Cinética de crecimiento y producción de biomasa de <i>Scenedesmus sp</i> .....	24
3.1.2 Extracción y caracterización de compuestos etanólicos y acuosos de <i>Scenedesmus sp</i> .....	28
3.1.3 Actividades biológicas .....	33
3.1.3.1 Actividad antioxidante evaluada por el método DPPH.....	33
3.1.3.2 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de desnaturalización de proteínas .....	36
3.2 Verificación de la hipótesis .....	38
<b>CAPÍTULO V.-</b> .....	39
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	39
5.1 Conclusiones .....	39
5.2 Recomendaciones .....	41
<b>MATERIALES DE REFERENCIA</b> .....	42
Referencias Bibliográficas .....	42
Anexos .....	62
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 1</b> Materiales de laboratorio .....	14
<b>Tabla 3</b> Reactivos de laboratorio.....	15
<b>Tabla 4</b> Medio de cultivo .....	16
<b>Tabla 5</b> Parámetros de crecimiento calculados para el cultivo de <i>Scenedesmus sp</i> . en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR.....	26
<b>Tabla 6</b> Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos etanólicos y acuosos de <i>Scenedesmus sp</i> .....	29

<b>Tabla 7</b> Contenido de carotenoides totales en los extractos etanólicos y acuosos de <i>Scenedesmus sp.</i> .....	31
<b>Tabla 8</b> Capacidad antioxidante determinada por el método DPPH de los extractos etanólicos y acuosos de <i>Scenedesmus sp.</i> .....	33
<b>Tabla 9</b> Actividad antiinflamatoria del extracto hidroetanólico (etanol-agua 80:20) de <i>Scenedesmus sp.</i> y del diclofenaco de sodio .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esquema de clasificación de microalgas .....	2
<b>Figura 2</b> Producción de biomasa microalgal.....	7
<b>Figura 3</b> Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus sp.</i> en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR .....	24

## RESUMEN

El creciente interés por sustituir moléculas sintéticas con moléculas de origen natural ha incrementado la demanda de fuentes biológicas, se ha utilizado principalmente a las plantas con este fin; sin embargo, las microalgas representan una estrategia altamente competitiva. Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos fácilmente cultivables y escalables. La presente investigación se enfoca en el estudio de las bioactividades de *Scenedesmus* sp. de origen ecuatoriano para dar a conocer su potencial como fuente de moléculas bioactivas naturales. El cultivo de la microalga se realizó en un medio de bajo costo elaborado a partir del fertilizante BASFOLIAR (10:4:7) y agua, y se expuso a una iluminación constante. Los extractos hidroetanólicos y acuosos obtenidos de *Scenedesmus* sp. fueron caracterizados en base a ensayos cuantitativos para fenoles, flavonoides y carotenoides totales. La mayor concentración de estos metabolitos se alcanzó en el extracto obtenido con etanol:agua 80:20 (porcentaje volumen:volumen). Los extractos fueron evaluados en cuanto a su actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria con el ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y de inhibición de la desnaturalización de la albúmina, respectivamente. Como los mejores resultados para las bioactividades se obtuvieron 6,37 micromoles de Trolox por gramo de peso seco y 41,40 por ciento de capacidad de inhibición de radicales DPPH; y 38,42 por ciento de capacidad de inhibición de la desnaturalización de la albúmina para el extracto hidroetanólico rico en compuestos bioactivos.

**Palabras clave:** actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, metabolitos bioactivos, compuestos bioactivos, microalgas, *Scenedesmus* sp.

## ABSTRACT

Growing interest for replacing synthetic molecules with natural ones has increased the demand of biological sources; it has been used like mainly source the plants; however, the microalgae represent a highly competitive strategy. Microalgae are unicellular photosynthetic microorganisms, which are easily of culture and scale. The present investigation is focused on the study of the bioactivities of Ecuadorian *Scenedesmus* sp. to give information about its potential like source of bioactive natural molecules. The culture of microalgae was done with a low-cost medium elaborated using BASFOLIAR (10:4:7) fertilizer and water, and the culture was exposed to continuous illumination. The hydroethanolic and aqueous extracts obtained from *Scenedesmus* sp. were characterized with quantitative essays for total phenols, flavonoids, and carotenoids. The high concentration of these metabolites was achieved with the extract obtained with ethanol:water 80:20 (volume:volume percentage). The extracts were evaluated for antioxidant and anti-inflammatory activity with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) assay and inhibition of denaturalization of albumin assay, respectively. Like the best results for the bioactivities were obtained 6,37 micromoles of Trolox per gram of dry weight and 41,40 percent of imbibition of DPPH radical capacity and 38,42 percent of imbibition of albumin denaturation capacity, both for the hydroethanolic extract rich in bioactive compounds.

**Palabras clave:** antioxidant activity, anti-inflammatory activity, bioactive metabolites, bioactive compounds, microalgae, *Scenedesmus* sp.

# CAPÍTULO I.-

## MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes Investigativos

#### 1.1.2 Moléculas bioactivas naturales

En las últimas décadas ha aumentado exponencialmente el interés por productos que presenten en su composición sustancias de origen natural (**Anwar et al., 2018**). Esta tendencia se ha desarrollado debido a los efectos negativos que presentan varias moléculas sintéticas; por ejemplo, el constante empleo de antioxidantes y antiinflamatorios induce reacciones cancerígenas, toxicológicas e inmunodepresoras (**Khumalo et al., 2022**). Además, este tipo de moléculas, sobre todo las de venta libre, constituyen uno de los compuestos más comunes de microcontaminantes en el medio edáfico (**Guzik & Wojcieszńska, 2019**). La búsqueda de moléculas bioactivas naturales ha ganado una gran acogida dentro de la comunidad científica y la industria, y los recursos más utilizados para este fin son los de origen vegetal (**Lourenço et al., 2019**).

Existen compuestos vegetales que pueden ser aprovechados industrialmente gracias a sus efectos antioxidantes, antimicrobianos, antiinflamatorios, antitumorales, etc. Estos pueden ser encontrados en diversos materiales vegetales (hierbas, especias, semillas, frutas y verduras), por lo que, su extracción ha sido objeto de numerosos estudios (**Neelam et al., 2019**). A pesar de esta gran acogida de las especies vegetales para la producción de compuestos bioactivos, se ha venido proponiendo a las microalgas como un recurso mucho más competitivo para la producción de materias primas (**Benedetti et al., 2018**).

#### 1.1.3 Microalgas

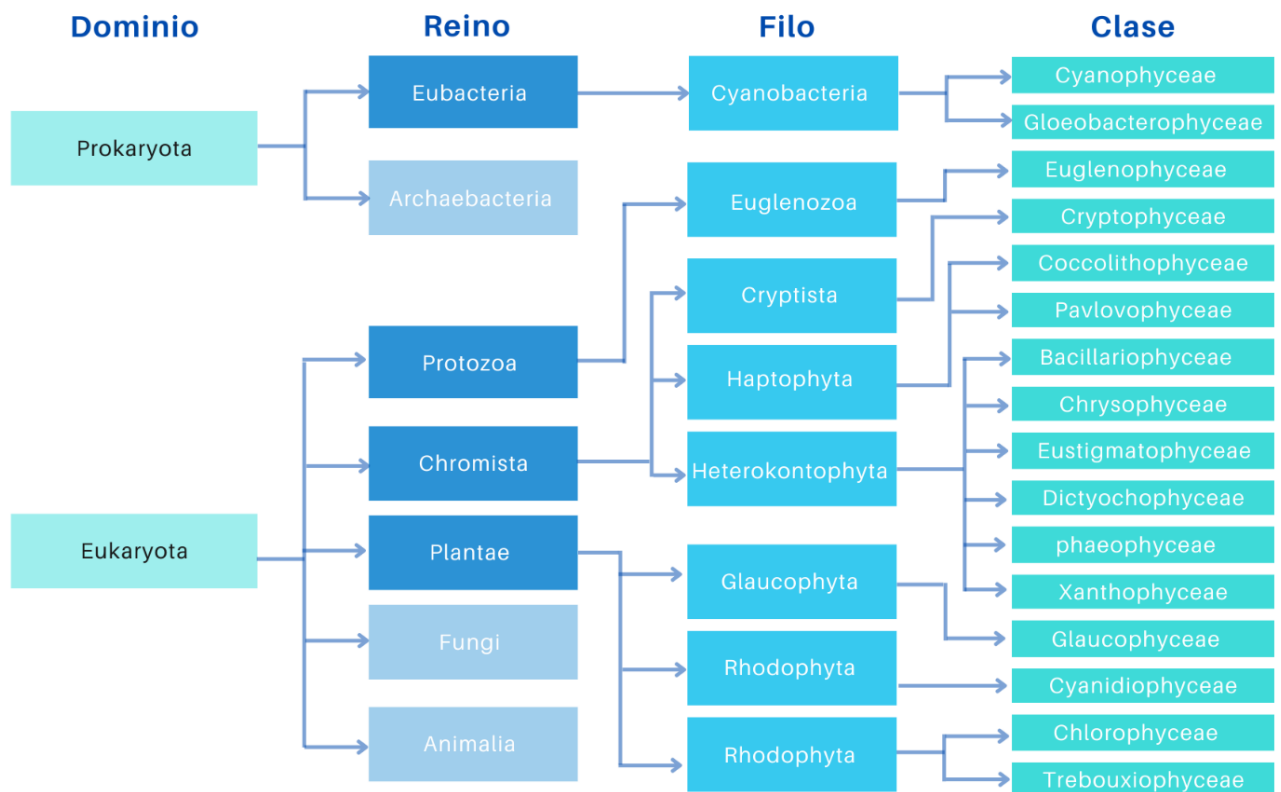
Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que utilizan energía luminosa y nutrientes inorgánicos para producir oxígeno y biomasa (**Fernandes & Cordeiro, 2021**). Estos organismos filamentosos habitan en diversos ambientes acuáticos, incluyendo lagos, ríos, océanos e incluso aguas residuales. Son capaces de crecer en varias latitudes y ecosistemas; por lo que, pueden

tolerar una amplia gama de temperaturas, salinidades, valores de pH e intensidades de luz (Khan et al., 2018).

El término microalgas une las algas microscópicas y las bacterias fotosintéticas oxigénicas (Del Mondo et al., 2021); por lo tanto, la primera distinción es entre procariontas y eucariotas, siendo estas últimas más grandes, más complejas y pueden ser unicelulares o multicelulares; mientras que, los procariontas son organismos unicelulares simples y pequeños (Hotos, 2021). Uno de los últimos modelos de clasificación incluye dos dominios principales, Prokaryota y Eukaryota que reúnen siete reinos: Archaeobacteria, Eubacteria, Protozoa, Chromista, Fungi, Plantae y Animalia (Figura 1) (Levasseur et al., 2020).

**Figura 1**

*Esquema de clasificación de microalgas.*



*Nota:* Adaptado de “A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification” (p. 3), W. Levasseur et al., 2020, *Biotechnology Advances*, 41(1).

Todos estos microorganismos poseen una gran capacidad de adaptación, que se debe a varias estrategias como el cambio en tamaño o morfología, modificaciones en el ciclo de vida y transformaciones fisiológicas en respuesta a variaciones ambientales que provocan variaciones en la síntesis de pigmentos y metabolitos (**Gauthier et al., 2020**). Esta gran habilidad adaptativa las convierte en biofábricas sostenibles muy prometedoras para producción de biomoléculas de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria y de biocombustibles (**Fernandes & Cordeiro, 2021**).

#### **1.1.4 Potencial de las microalgas como fuente de agentes biológicamente activos**

Las microalgas representan una alternativa altamente competitiva como fuente de compuestos activos frente a las plantas (**Anwar et al., 2018**); esto debido a que crecen a una velocidad mucho más alta y se requiere de una mínima cantidad de espacio para la producción equivalente de biomasa (**Singh et al., 2017**). Además, estos microorganismos son metabólicamente flexibles, su crecimiento no se limita a temporadas y se requiere de infraestructura básica de baja tecnología para su cultivo (**Benedetti et al., 2018; Pavlov, 2019**); por lo que, varios estudios recientes se enfocan en la evaluación de bioactividades de varios géneros de microalgas, entre los principales se encuentran: *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, entre otras.

*Arthrospira (Spirulina)* (Clase: **Cyanophyceae**). Son microalgas simbióticas, multicelulares y filamentosas de color verde azulado (**Gabr et al., 2020**). Son ampliamente utilizadas como un suplemento dietético y se producen comercialmente en grandes estanques al aire libre bajo condiciones controladas (**Wan et al., 2021**). El potencial bioactivo de la espirulina se continúa evaluando en estudios preclínicos utilizando modelos animales, y se ha visto que sus compuestos presentan fuertes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (**Izadi & Fazilati, 2018**), así como actividad antimicrobiana (**Pina-Pérez et al., 2022**), antihipertensiva, antidiabética (**Lafarga et al., 2021**), anticancerígena (**Mahendran et al., 2022**), entre otras.



***Scenedesmus* (Clase: Chlorophyceae).** Las especies de *Scenedesmus* son células individuales elípticas, generalmente fusionadas en colonias (Carneiro et al., 2021). Son dominantes en lagos y ríos de agua dulce (Bulut et al., 2019). Varias especies son utilizadas para diversos fines por su capacidad para adaptarse a duras condiciones ambientales, rápido crecimiento y facilidad de cultivo y manipulación (Patil & Kaliwal, 2019). Las bioactividades de sus compuestos son: actividad antioxidante, antimicrobiana (Arguelles, 2018), antiinflamatoria, antidiabética (Patil & Kaliwal, 2019), anticancerígena (Marrez et al., 2019), antifúngica (Carneiro et al., 2021), etc.

***Chlorella* (Chlorophyceae).** Las especies de *Chlorella* son células de forma esférica, sin flagelos que se distribuyen en ambientes de agua dulce, marinos y terrestres; tiene una alta capacidad fotosintética y de crecimiento rápido en condiciones autótrofas, mixotróficas y heterótrofas (Tiong et al., 2020). Los extractos obtenidos de este género presentan una actividad antioxidante y antifúngica (Carneiro et al., 2021), así como propiedades pro-curativas, antiinflamatorias (Gonçalves et al., 2019), anticoagulantes (Mousavian et al., 2022), antivirales, antitumorales y de inmunomodulación (Tiong et al., 2020).

***Nannochloropsis* (Clase: Eustigmatophyceae).** Las especies de *Nannochloropsis* son unicelulares, planctónicas, con células subesféricas; viven en agua dulce y de mar (Zanella & Vianello, 2020). Los compuestos obtenidos de las especies de este género presentan actividad antibacteriana (Verdugo-González et al., 2019), antioxidante (Banskota et al., 2018), antiinflamatoria y antifúngica (Scaglioni et al., 2018).

***Dunaliella* (Clase: Chlorophyceae).** Las especies de *Dunaliella* son células biflageladas en forma de pera, fotoautótrofas y halotolerantes, conocidas por su capacidad de acumular  $\beta$ -caroteno (Wolf et al., 2021). Se ha encontrado que varios compuestos producidos por estas especies presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, anticolinérgica (Gallego et al., 2021) analgésica, efectos inmunomoduladores (da Silva et al., 2021), entre otras.

***Chlamydomonas* (Clase: Chlorophyceae).** Son microalgas flageladas unicelulares, se encuentran en agua estancada, suelo húmedo, en agua dulce y

agua de mar (**Faraloni et al., 2021**). Extractos de estas microalgas han mostrado actividad antioxidante, anticancerígena (**Kamble et al., 2018**), antiinflamatoria y anticonceptiva (**Andrade et al., 2021**), así como efectos inmunomoduladores y potenciadores del crecimiento del cabello (**Tanaka et al., 2019**).

#### **1.1.5 Principales metabolitos bioactivos microalgales**

Las microalgas son reservorios únicos de compuestos bioactivos, estas producen varios metabolitos secundarios que les confieren esta característica, entre los principales se encuentran: compuestos fenólicos, carotenoides, y flavonoides, los cuales además tienen gran importancia farmacéutica (**Patil & Kaliwal, 2019**). La síntesis de estos metabolitos en microalgas responde a cambios en el ambiente externo como: temperatura, luz, pH y composición nutricional. Así, la manipulación de las condiciones de cultivo estimula la biosíntesis de compuestos bioactivos específicos (**Suasnavas et al., 2018**).

Los fenoles son biomoléculas secundarias que tienen un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes (**Kaurinovic & Vastag, 2019**). Estas biomoléculas tienen efectos beneficiosos para la salud humana principalmente debido a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, ya que son capaces de eliminar y reducir las ROS intracelulares y estimular la expresión de enzimas involucradas en: el metabolismo del oxígeno, desintoxicación de xenobióticos y supresión simultánea de vías de señalización vinculadas a reacciones inflamatorias (**Del Mondo et al., 2021**).

Para hacer frente a las variaciones ambientales (salinidad, radiación ultravioleta, luz o disponibilidad de nutrientes), las microalgas pueden producir diferentes tipos de compuestos fenólicos (**Del Mondo et al., 2021**). La luz es el factor más significativo para la modulación de estos compuestos, ya que se ha demostrado una mayor producción de polifenoles en condiciones de mucha luz (**Coulombier et al., 2020; Sulaiman & Balachandran, 2012**).

Los flavonoides son un grupo de polifenoles que presentan un esqueleto básico de 15 carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), que consta de dos anillos de benceno (C<sub>6</sub>) unidos por una cadena lineal de tres carbonos (C<sub>3</sub>) (**Kaurinovic & Vastag, 2019**). Son

reconocidos principalmente por su actividad antioxidante, pero también presentan propiedades antiinflamatorias, vasorelajantes, anticoagulantes, antidepresivas, entre otras (**Amarowicz & Pegg, 2019**). El contenido de flavonoides presente en microalgas también varía en respuesta a la luz, siendo una alta luminosidad la que provoca un elevado desarrollo de flavonoides (**Del Mondo et al., 2021**).

Y los carotenoides son pigmentos tetraterpénicos, que exhiben colores amarillo, naranja, rojo y púrpura; y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en varios organismos fotosintéticos (**Maoka, 2020**). Los carotenoides protegen a la célula contra el estrés oxidativo disipando el exceso de energía a través del ciclo de las xantofilas y eliminando las ROS (**Coulombier et al., 2020**). Dependiendo de la intensidad y fotoperiodo de luz, puede haber una variación entre la cantidad de los pigmentos fotosintéticos primarios y secundarios, ya que los primarios generalmente disminuyen con un exceso de luz, mientras que los carotenoides secundarios aumentan (**Stoia & Oancea, 2022**).

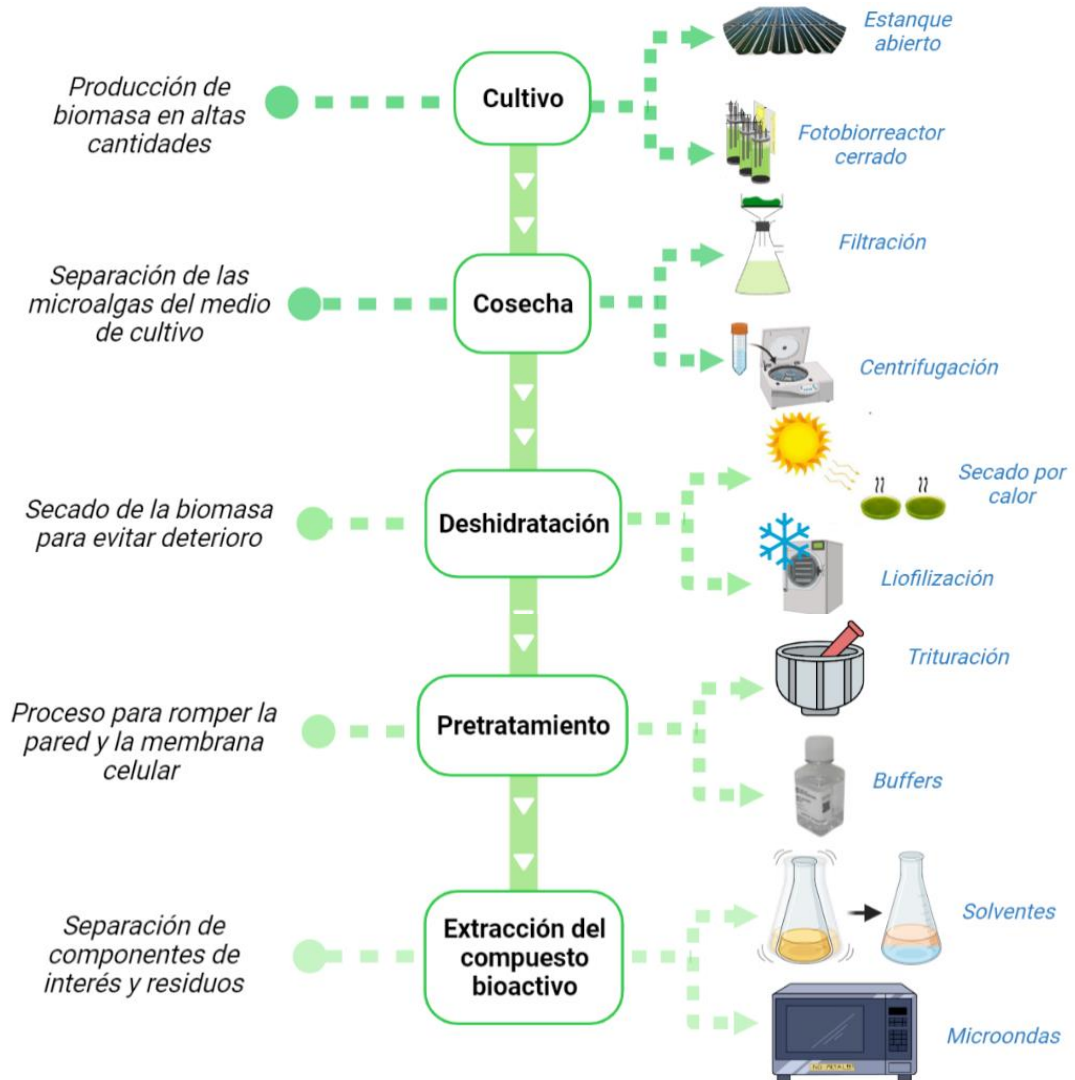
#### **1.1.6 Producción de biomasa y extracción de compuestos bioactivos**

El proceso de producción de biomasa de microalgas engloba varios pasos como el cultivo, la cosecha y la deshidratación; posteriormente, se procede con el procesamiento de la biomasa, que incluye al pretratamiento y la extracción de componentes bioactivos como se muestra en la Figura 2.

Hay dos sistemas desarrollados para la producción o cultivo de biomasa de algas: las tecnologías de estanque abierto y fotobiorreactor cerrado (PBR). El estanque abierto es mucho más económico (**Benedetti et al., 2018**); sin embargo, los PBR proporcionan un sistema de cultivo cerrado excelente y controlado para el cultivo, evitando el peligro o la contaminación y la competencia de otras microalgas (**Balasubramaniam et al., 2021**).

**Figura 2**

*Producción de biomasa microalgal.*



La cosecha o recolección se refiere a la separación de la biomasa microalgal del medio de cultivo; puede lograrse mediante floculación, flotación, filtración y centrifugación. Con la floculación se provoca una agregación de microalgas al añadir agentes floculantes y con la flotación se hace que las células floten a la superficie del medio al usar un dispersor de burbujas de aire (**Balasubramaniam et al., 2021**). Por otro lado, la filtración se basa en el uso de una membrana porosa para separar las algas de un medio líquido (**Kapoor et al., 2021**); mientras que, la centrifugación aprovecha la fuerza gravitatoria,

convirtiéndola en una técnica rápida, fácil y eficiente (**Morais-Junior et al., 2020**).

Para alargar la vida útil de la biomasa de microalgas, esta se procesa secándola o deshidratándola (**Show et al., 2019**). Para ello, se puede utilizar secado al sol, por aire caliente, por aspersión o liofilización. La liofilización se usa a escala de laboratorio y deshidrata directamente la biomasa mediante un mecanismo de sublimación (**de Farias-Neves et al., 2020**). En el secado por aspersión se obtiene el polvo de biomasa a partir de una fina aspersión de gotas en suspensión que está en contacto con aire caliente (**Hosseinizand et al., 2017**). Y el secado en horno o con el sol son los métodos más económicos, se basan en el calor producido por el equipo o el sol para deshidratar la biomasa (**Balasubramaniam et al., 2021; Kapoor et al., 2021**).

Previo al proceso de extracción, es necesario lisar las células para liberar el compuesto bioactivo almacenado (**Gonzalez-Fernandez & Muñoz, 2017**). Con las células ya lisadas, la extracción se puede lograr de varias formas: con métodos mecánicos (molienda de perlas, homogeneización, microondas y ultrasonido), químicos (disolventes) y biológicos (enzimas). El método elegido para el proceso de pretratamiento se basa en los productos finales deseados (**Balasubramaniam et al., 2021**).

La extracción tradicional por solventes orgánicos (etanol, metanol, hexano, acetona, etc) es el método más utilizado para la obtención de compuestos bioactivos gracias a su bajo costo de procesamiento, facilidad de uso, simplicidad en la operación, al amplio rango de aplicabilidad y la posibilidad de uso en el campo industrial (**Garcia-Vaquero et al., 2021; Ventura et al., 2017**). Los principales parámetros para considerar en la elección de un solvente para la extracción de compuestos de microalgas son la polaridad o extractabilidad, la liposolubilidad, la miscibilidad en agua (capacidad para sistemas bifásicos) y la baja toxicidad (**Salinas-Salazar et al., 2019**).

## **1.1.7 Moléculas antioxidantes**

### **1.1.7.1 Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo surge debido a un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes, se asocia con daños en especies moleculares como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (**Ávila- Escalante et al., 2020**). Se ha encontrado evidencia de que radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno (RNS) y especies reactivas de azufre son importantes en el desarrollo de enfermedades comunes, como la aterosclerosis, la insuficiencia renal crónica y la diabetes mellitus (**Ali et al., 2020**).

### **1.1.7.2 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se refiere a la limitación o inhibición de la oxidación de compuestos celulares al restringir reacciones de cadenas oxidativas (**Guclu et al., 2020**). Esta actividad es propia de moléculas antioxidantes sintéticas o naturales, que previenen, retardan o eliminan el daño celular y tisular que surgen como consecuencia del estrés oxidativo (**Gulcin, 2020**). Existe una amplia gama de defensas antioxidantes, tanto endógenas como las suministradas exógenamente en la dieta, para proteger los componentes celulares del daño inducido por los radicales libres (**Yang et al., 2021**).

Las moléculas antioxidantes más utilizadas son: el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y el galato de propilo (PG) (**Ali et al., 2020**). No obstante, a la ingesta a largo plazo de estas moléculas antioxidantes sintéticas se le relaciona con varios efectos negativos en la salud humana como alergias en la piel, problemas del tracto gastrointestinal y un efecto cancerígeno (**Lourenço et al., 2019; Stoia & Oancea, 2022**). Por esto, la evaluación de la actividad antioxidante de moléculas naturales ha sido objetivo de varias investigaciones actuales (**Gulcin, 2020**).

### 1.1.7.3 Evaluación de la actividad antioxidante

Existen varios métodos *in vitro* para la evaluación de la actividad antioxidante, estos se clasifican dentro de dos grupos, los que se basan en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), y los basados en la transferencia de electrones (ET) (**Gulcin, 2020**); los más utilizados son:

Ensayo DPPH (2,20-difenil-1-picrylhydrazyl radical): De tipo HAT y ET. Se da un proceso de reducción donde hay un cambio de coloración del reactivo DPPH de color violeta a amarillo pálido. Las moléculas capaces de reducir el DPPH son agentes antioxidantes (**Ermi Hikmawanti et al., 2021**).

Ensayo ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno): De tipo HAT. Con este ensayo se mide la fluorescencia final de la fluoresceína después de exponerla a agentes oxidantes. Mientras más se conserve la fluorescencia de la fluoresceína, mejor es la actividad antioxidante de los compuestos (**Sasikumar et al., 2021**).

Ensayo FRAP (reducción férrica poder antioxidante): De tipo ET. Se da la reducción del complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ al complejo azul  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ. El cambio de color se correlaciona con la capacidad antioxidante (**Sasikumar et al., 2021**).

Si existen resultados satisfactorios con los métodos *in vitro* se puede pasar al uso de pruebas *in vivo* para la determinación de la actividad antioxidante, donde se administra dosificaciones definidas de las muestras a analizar a animales de prueba, y se los sacrifica después de un periodo determinado para analizar su sangre o tejidos (**Martinello et al., 2021**).

## 1.1.8 Moléculas antiinflamatorias

### 1.1.8.1 Respuesta inflamatoria

El proceso inflamatorio es una respuesta defensiva, compleja y crucial del cuerpo humano, suele ser inducida por infecciones microbianas o por una lesión o trauma tisular (inflamación estéril) (**Danraka et al., 2021**). En la mayoría de

los casos, la inflamación es una respuesta inmunitaria específica y autocontrolada (**Vanderwall & Milligan, 2019**).

A veces la respuesta inflamatoria puede provocar una interrupción en la homeostasis de procesos fisiológicos, lo que ocasiona un daño sistémico crónico y trastornos inflamatorios (**Vanderwall & Milligan, 2019**). Esta respuesta desregulada se da porque durante la respuesta inflamatoria participan ROS, RNS y diferentes proteasas, que pueden provocar daño tisular o fibrosis, que contribuye en la cronicidad de la inflamación (**Maleki et al., 2019**).

### **1.1.8.2 Actividad Antiinflamatoria**

La actividad antiinflamatoria presente en ciertas moléculas asegura la resolución de procesos inflamatorios (**Maleki et al., 2019**). Al igual que con las moléculas antioxidantes, existen antiinflamatorios endógenos y otros suministrados externamente. Varios neuropéptidos y mediadores lipídicos que se producen durante una respuesta inflamatoria en curso actúan como agentes antiinflamatorios endógenos (**Vik et al., 2017**). Sin embargo, en algunos casos, la actividad de estos antiinflamatorios no es suficiente; por lo que, es necesario suministrar medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), que son ampliamente utilizados para tratar el dolor, la fiebre y otros procesos inflamatorios (**Lee et al., 2020**).

Al igual que como sucede con los antioxidantes, el prolongado uso de los antiinflamatorios sintéticos como: ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, etc. provoca varios efectos negativos (**Khumalo et al., 2022**). Entre los principales inconvenientes del uso de estas moléculas sintéticas está el deterioro en las funciones renales, gastrointestinales, cardiovasculares e inmunológicas; así como el desarrollo de hiperglucemia, osteoporosis, hirsutismo y reacciones de hipersensibilidad (**Parolini, 2020**). Además, los antiinflamatorios constituyen uno de los compuestos más comunes de contaminantes biológicamente activos del medio ambiente (**Guzik & Wojcieszńska, 2019**); por lo que, la búsqueda de moléculas naturales como sustitutas de las sintéticas, se ha convertido en una tendencia actual.



### **1.1.8.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria**

La actividad antiinflamatoria puede ser determinada a través de ensayos *in vitro* con líneas celulares de macrófagos, mastocitos, adipocitos, etc. de humanos u otros animales de prueba. También es posible utilizar pruebas de inhibición de enzimas que catalizan la formación de compuestos tóxicos o de inhibición de procesos relacionados con la desnaturalización de proteínas, ya que son los mecanismos más comunes de la inflamación (**Aziz et al., 2018**).

Para comprender los procesos biológicos detrás de los mecanismos antiinflamatorios de las sustancias evaluadas se pueden realizar ensayos *in vivo* donde se utiliza animales de prueba dosificados con las sustancias a evaluar durante un tiempo determinado (**Martinello et al., 2021**).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General:**

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de compuestos producidos por *Scenedesmus* sp. a través de ensayos *in vitro* para su posible aplicación como sustitutos de moléculas sintéticas.

### **1.2.2 Objetivos Específicos:**

- Obtener biomasa microalgal a partir del cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.
- Extraer compuestos microalgales utilizando diferentes proporciones de disolventes.
- Determinar la actividad antioxidante de extractos fenólicos de *Scenedesmus* sp. mediante el ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).
- Determinar la actividad antiinflamatoria de extractos fenólicos de *Scenedesmus* sp. mediante el método de desnaturalización de la albúmina.

**CAPÍTULO II.-**  
**METODOLOGÍA**

**2.1 Materiales**

**2.1.1 Materiales de laboratorio**

**Tabla 1**

*Materiales de laboratorio*

<b>INSUMO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Balón fondo plano (250 mL)	2
Recipientes vidrio (1 L)	2
Tubos Eppendorf (1,5 mL)	1 paquete
Tubos Falcon (15 mL)	1 paquete
Tubos Falcon (50 MI)	1 paquete
Vaso de precipitación (100 MI)	3
Vaso de precipitación (250 MI)	2
Pipeta (10 MI)	1
Micropipeta 10 – 100 MI	1
Micropipeta 20 – 200 MI	1
Micropipeta 100 – 1000 MI	1
Papel filtro en discos	10
Puntas de micropipetas	30
Papel aluminio	1
Cámara de Neubauer	1

### 2.1.2 Equipos

**Tabla 2**

*Equipos de laboratorio*

<b>INSUMO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Microscopio óptico	1
Estufa	1
Vórtex	1
Plancha de agitación orbital	1
Centrífuga (tubos de 15 MI)	1
Refrigerador	1
Espectrofotómetro	1
Potenciómetro	1
Baño térmico	1

### 2.1.3 Reactivos

**Tabla 3**

*Reactivos de laboratorio*

<b>INSUMO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Etanol	1 L
Reactivo de Folin-Ciocalteu	5 MI
Carbonato de sodio	2 MI
Ácido gálico	2 g
Nitrito de sodio (NaNO <sub>2</sub> )	0,3 MI

<b>INSUMO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Cloruro de aluminio (AlCl <sub>3</sub> )	0,3 MI
Hidróxido de sodio (NaOH)	2 MI
2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo	1 g
Tolox	1 g
Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de potasio	0,2 g
Fosfato de disodio	1,44 g
Fosfato monopotásico	0,44 g
Diclofenaco de sodio	0,1 g

#### 2.1.4 Medio de cultivo

**Tabla 4**

*Medio de cultivo*

<b>INSUMO</b>	<b>CANTIDAD</b>
Fertilizante BASFOLIAR (N, P y K – 10, 4 y 7%)	1 L

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Hipótesis

#### **Hipótesis nula**

Los extractos hidroetanólicos y acuosos de la microalga *Scenedesmus* sp. de origen ecuatoriano no presentan actividad antioxidante ni antiinflamatoria.

#### **Hipótesis alternativa**

Los extractos hidroetanólicos y acuosos de la microalga *Scenedesmus* sp. de origen ecuatoriano presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

## 2.2.2 Variables

### **Variables dependientes**

- Actividad antioxidante
- Actividad antiinflamatoria

### **Variables independientes**

- Tipos de disolventes usados en la extracción
- Relación material microalgal/volumen del disolvente

## 2.2.3 Sección experimental

### *2.2.3.1 Preparación del medio de cultivo*

Para preparar los medios de crecimiento se utilizó la metodología descrita por **Brito et al., (2016)** con modificaciones. Para ello, se usó el fertilizante comercial BASFOLIAR (10:4:7); se utilizó la relación de 3 mL de fertilizante por cada litro de agua utilizada. Inicialmente, para el proceso de masificación se preparó dos balones de fondo plano de 250 mL autoclavados con 125 mL de agua destilada, y se añadió 0,75 mL del fertilizante.

### *2.2.3.2 Siembra de la microalga en el medio preparado*

Los cultivos se iniciaron con un inóculo de  $1,3 \times 10^6$  células/mL proveniente de un cultivo madre de *Scenedesmus* sp. adquirido de la colección de microalgas de la Universidad Politécnica Salesiana. El inóculo fue sembrado en cada uno de los balones de fondo plano previamente preparados con el medio de cultivo; estos cultivos sirvieron para el mantenimiento de la microalga y como fuente del inóculo para la resiembra en frascos de mayor volumen (**Apandi et al., 2022; Suasnavas et al., 2017**).

### *2.2.3.3 Incubación de las microalgas*

Los balones de 250 mL se acondicionaron en un estante con luz artificial de 3000 lux, mediante lámparas fluorescentes de 32 W, y se los mantuvo bajo un fotoperíodo de 24 horas luz. Además, se adaptó un sistema de compresión

construido con mangueras de un diámetro ¼ pulgada (6,35 mm), conectadas a bombas de aire de peceras de 2.5 W de poder. La fusión de las pequeñas burbujas proporcionó oxígeno y agitación para evitar la sedimentación de las microalgas (Acurio-Méndez & Arciniegas-Solarte, 2015).

#### 2.2.3.4 Resiembra en recipientes de 1 litro

Para realizar la resiembra de la microalga es necesario conocer la concentración celular de microalgas original y a la que se pretende llegar; por lo que, se aplicó la siguiente fórmula (Apandi et al., 2019):

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

$C_1$ : Concentración actual  $\left(\frac{cel}{mL}\right)$

$V_1$ : Volumen a tomar del cultivo actual (mL)

$C_2$ : Concentración a la que se quiere llegar  $\left(\frac{cel}{mL}\right)$

$V_2$ : Volumen al que se pretende llegar (mL)

La resiembra se realizó en tres frascos de 1 litro con 750 mL ( $V_2$ ) de medio de cultivo cada uno, y al ser adecuada una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL ( $C_2$ ) para iniciar este tipo de cultivos, se añadió un volumen de 50 mL de los frascos de mantenimiento que alcanzaron una concentración de  $1,5 \times 10^7$  ( $C_1$ ) después de 8 días.

Estos recipientes fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de iluminación, aireación, agitación y temperatura que el cultivo de mantenimiento. Se realizaron conteos diarios durante 15 días para la obtención de la curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp. y se elaboró una gráfica de la Densidad Celular vs. Tiempo para evaluar el crecimiento de la microalga.

#### ***2.2.3.5 Remoción del medio y secado de la biomasa***

Para la remoción del medio y secado de biomasa se siguió el procedimiento descrito por **Suasnavas et al., (2017)**, el proceso se llevó a cabo durante la fase estacionaria de crecimiento de *Scenedesmus* sp, Para remover el medio de cultivo, se realizaron varios lavados con agua destilada; para ello, se centrifugaron alícuotas de 30 mL y se desechó el sobrenadante (medio de cultivo), se añadió agua destilada y se centrifugó nuevamente, de esta manera se aseguró la eliminación completa del medio.

Inmediatamente se procedió con un proceso de deshidratación mediante una incubación a 40 °C en una estufa, durante 24 horas aproximadamente. Seguido al proceso de secado, se trituró la biomasa deshidratada en un mortero de porcelana con el fin de obtener un polvo homogéneo, este se almacenó en tubos de plástico tras pesar la masa obtenida. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se los almacenó en un refrigerador a una temperatura de 4 °C hasta que se realizó el proceso de extracción.

#### ***2.2.3.6 Extracción con diferentes disolventes***

Para el proceso de extracción se pesó la biomasa algal previamente secada y molida en una cantidad aproximada de 5 gramos. Se utilizaron tres solventes para las extracciones: etanol/agua (80:20 v/v), etanol/agua (50:50 v/v) y agua; con tres relaciones material microalgal/volumen de disolvente: 1/10, 1/20 y 1/30. Posteriormente, se mezclaron las muestras de las microalgas con los disolventes, se agitaron en vórtex y se incubaron durante 30 minutos con agitación orbital continua, en la oscuridad, a 30 °C. Cada mezcla se centrifugó durante 10 min a 400 rpm y se recogió el sobrenadante. Luego, los extractos se filtraron a través de filtros de 0,22 µm y se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 4 °C en la oscuridad hasta su análisis (**Monteiro et al., 2020**).

#### ***2.2.3.7 Determinación de fenoles totales***

Se realizó un ensayo del contenido fenólico total mediante el método de Folin y Ciocalteu modificado. Para esto, en una placa de 96 micropocillos se mezclaron



10 µL de cada muestra con 130 µL de agua destilada, posteriormente, se añadió 10 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu 2 N. Después de 6 minutos de reacción se añadió 100 µL de una solución de carbonato de sodio al 7% (p/v). Se dejó en incubación durante 90 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm. Para la calibración se utilizó una curva estándar, preparada con soluciones seriadas de ácido gálico (GAE) que varían de 10 a 100 mg/L. Los análisis se realizaron por triplicado y el contenido fenólico total se expresó como equivalentes de miligramos de ácido gálico por gramo de peso seco de la muestra (mg GAE/g DW) (**Baek et al., 2021**).

### ***2.2.3.8 Determinación de flavonoides totales***

Se llevó a cabo un ensayo de contenido total de flavonoides con el método colorimétrico de cloruro de aluminio. Inicialmente, se mezcló 60 µL del extracto con 120 µL de cloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) al 2% (p/v) y se incubó la mezcla durante 60 minutos. La absorbancia se midió a 420 nm. También se realizó una curva estándar utilizando soluciones de quercetina (QE) en serie que varían de 10 a 100 mg/L y los resultados se expresaron como equivalentes de miligramos de quercetina por gramo de peso seco de muestra (mg QE/g DW) (**N'guessan et al., 2021**).

### ***2.2.3.9 Determinación de carotenoides totales***

Se determinó el contenido total de carotenoides mediante el método espectrofotométrico. Se midió la absorbancia a 470, 652 y 665 nm de los extractos obtenidos disueltos en metanol puro. Y para calcular el contenido de carotenoides se aplicó las ecuaciones de Lichtenthaler (**Bulut et al., 2019**):

$$c_a \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = 16,72A_{665} - 9,16A_{652}$$

$$c_b \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = 34,09A_{652} - 15,28A_{665}$$

$$c_{(x+c)} \left( \frac{\mu g}{mL} \right) = \frac{1000A_{470} - 1,63A_{c_a} - 104,96c_b}{221}$$

Donde:

$c_a$  y  $c_b$  son concentraciones de clorofila a y b, respectivamente

$c_{(x+c)}$  es la concentración de carotenoides totales.

Los resultados se expresaron como miligramos de carotenoides por gramo de peso seco de muestra (mg/g DW).

### 2.2.3.10 Ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH)

Para determinar la actividad antioxidante se determinó el porcentaje de inhibición de DPPH con la metodología descrita por **Torres-Da Silva et al., (2021)** con modificaciones. Para ello, se preparó una solución DPPH en metanol al 80%. Luego, se tomaron alícuotas 20  $\mu$ L de las soluciones estándar de trolox, del extracto de compuestos hidroetanólicos y acuosos obtenidos, y agua, y se mezclaron con 180  $\mu$ L de la solución de DPPH. Después de agitar, la mezcla se dejó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 40 min para leer la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 515 nm. Así se obtuvo el porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ de inhibición} = \left[ 1 - \left( \frac{A_{muestra} - A_{blanco}}{A_{control} - A_{blanco}} \right) \right] * 100$$

Donde:

$A_{control}$  es la absorbancia de la solución DPPH con agua como control,

$A_{muestra}$  es la absorbancia de la solución de DPPH con la muestra de extractos y,

$A_{blanco}$  es la absorbancia de la solución de DPPH con metanol.

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de la muestra y TEAC, es decir, actividad equivalente a Trolox ( $\mu$ M/g de peso seco). Se construyó una curva estándar de Trolox, a una concentración de 50 a 500  $\mu$ M en disolución de metanol al 80%.

### 2.2.3.11 *Ensayo de desnaturalización de la albúmina*

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos se realizó mediante la prueba de inhibición de la desnaturalización de la albúmina. Como patrón o fármaco estándar se utilizó diclofenaco sódico, ya que es un potente fármaco antiinflamatorio no esteroideo (Patil & Kaliwal, 2019). Primero se obtuvo la albúmina de huevo de gallina fresco, para lo cual se separó la yema de la clara, se recogió la clara en un recipiente de precipitados adecuado. Luego, se agregó aproximadamente 100 mL de agua destilada a la clara de huevo y se agitó suavemente hasta que se forme un precipitado de clara (ovoglobulinas). Posteriormente, se centrifugó la mezcla y se guardó el sobrenadante que es la ovoalbúmina (Castillo-Jácome, 2019).

Para realizar la prueba de desnaturalización, se mezclaron 2 mL del extracto con mayor actividad antioxidante o de diclofenaco sódico a diferentes concentraciones (100, 200, 500, 1000 µg/mL) con 2,8 mL de solución salina tamponada con fosfato (pH 6,4). Se añadió 0,2 mL de albúmina de huevo y se incubó a 37 °C durante 15 min. Se indujo la desnaturalización manteniendo la mezcla a 70 °C en agua durante 10 min. Después de que estas se enfriaron, se midió la absorbancia a 660 nm usando agua destilada como blanco o control negativo. Cada experimento se realizó por triplicado (Patil & Kaliwal, 2019).

El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina se calculó con:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{A_c - A_t}{A_c} * 100$$

Donde:

$A_t$  es la absorbancia en presencia de extractos/diclofenaco de sodio,

$A_c$  es la absorbancia del control (albúmina desnaturalizada).

### 2.2.4 **Análisis de datos**

Se aplicó un diseño experimental  $3^2$ , es decir, de dos factores (tipo de disolvente y proporción material microalgal/volumen de disolvente) con tres niveles cada

uno (etanol/agua (80:20 v/v), etanol/agua (50:50 v/v) y agua; en proporciones 1:10, 1:20 y 1:30). El análisis estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando Statgraphics Centurion 18 de StatPoint Technologies Inc., a través de un análisis de varianza ANOVA, seguido de una comparación de medias múltiples determinada mediante la prueba de Tukey (nivel de significancia del 95%,  $p < 0,05$ ).

## CAPÍTULO III.-

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

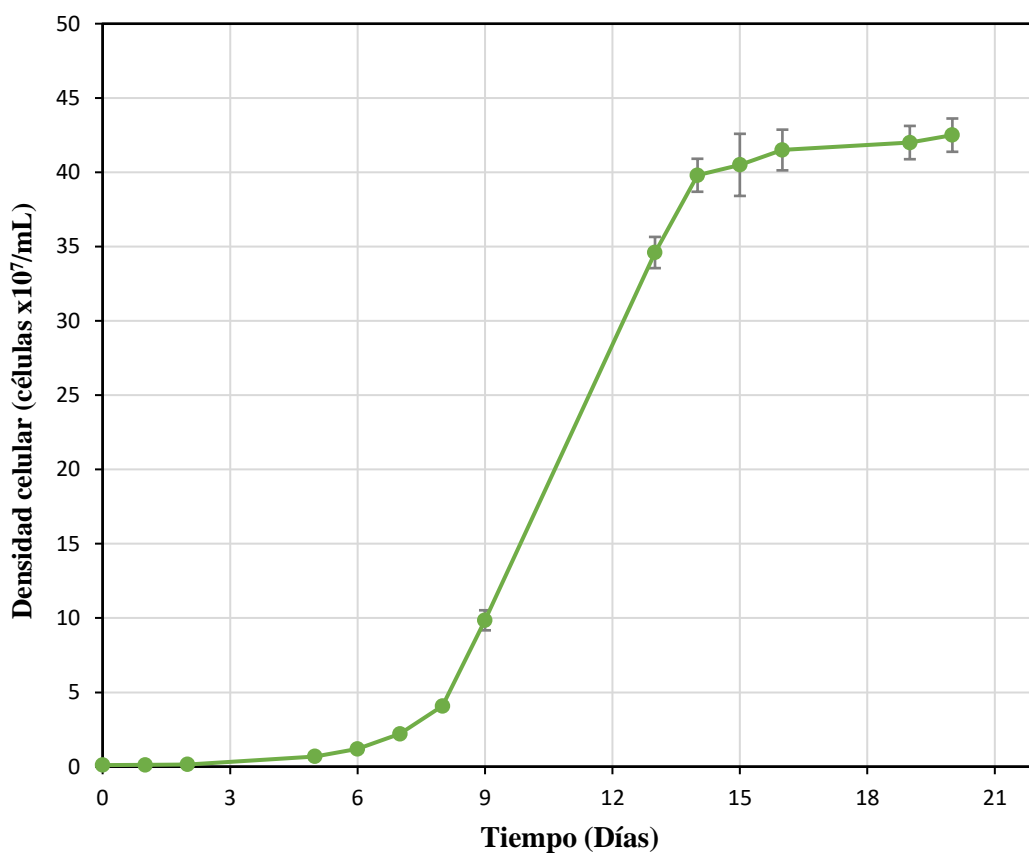
#### 3.1 Análisis y discusión de los resultados

##### 3.1.1 Cinética de crecimiento y producción de biomasa de *Scenedesmus* sp.

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp. durante 20 días de producción de biomasa en un medio de cultivo de bajo costo elaborado a partir del fertilizante BASFOLIAR (10:4:7). La curva fue construida en base a los datos obtenidos del conteo celular en la cámara de Neubauer (ANEXO A).

#### Figura 3

*Curva de crecimiento de Scenedesmus sp. en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR.*



*Scenedesmus* sp. es una especie de microalga capaz de crecer en condiciones nutricionales y ambientales simples, presentando tasas de crecimiento bastante altas (**Ambati et al., 2018**). Especies actualmente cultivadas como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella* sp., *Spirulina platensis*, entre otras, muestran varias limitaciones en su crecimiento y requieren de condiciones especiales controladas difíciles de mantener (**Hotos, 2021; Rajput et al., 2021**); por lo que, *Scenedesmus* sp. puede ser considerada como un productor alternativo eficiente de compuestos biológicamente activos.

La Figura 2 muestra la curva de crecimiento de las microalgas que consiste en una fase lag, fase log y fase estacionaria. La fase lag es una fase de inducción, las microalgas solo aumentan en tamaño, no en cantidad y están metabólicamente activas (**Carneiro et al., 2021**). En el gráfico se puede observar que esta fase transcurre desde el día 0 hasta el día 4, este corto periodo de tiempo es bastante conveniente, ya que el objetivo es obtener una alta cantidad de células.

En el día 5, el crecimiento microalgal ingresa a una fase log o de crecimiento exponencial. Aquí la densidad celular aumenta, ya que las células se dividen a una tasa máxima (**Fernandes & Cordeiro, 2021**). La fase log dura 9 días, tiempo conveniente para alcanzar concentraciones altas de biomasa; y cuando finaliza esta etapa, inicia la fase estacionaria.

Al iniciar la fase estacionaria la curva de crecimiento se vuelve horizontal, debido a que las células van dividiéndose y muriendo a la par (**Carneiro et al., 2021**). Curvas de crecimiento similares, con fases exponenciales de entre 7 a 10 días, se pueden encontrar en diversos estudios, tanto para esta especie de microalga (**Cerón et al., 2018; Chellamboli & Perumalsamy, 2016; Latiffi et al., 2017**), como para otras especies de microalgas (**Dahlin et al., 2018; Rosen et al., 2022**).

Para obtener los parámetros de la cinética de crecimiento de *Scenedesmus* sp. presentados en la Tabla 5, se utilizó los datos correspondientes a la fase exponencial de la curva de crecimiento (ANEXO B).

**Tabla 5**

*Parámetros de crecimiento calculados para el cultivo de Scenedesmus sp. en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR.*

<b>Parámetro</b>	<b>Valor alcanzado</b>
Tasa de crecimiento ( $r$ )	0,459 día <sup>-1</sup>
Tiempo generacional	1,509 días/división celular
Divisiones diarias	0,663 divisiones/día

Los parámetros de crecimiento muestran un valor de 1,509 días para el tiempo generacional, lo que significa que fue necesario alrededor de un día y medio para que se duplique la población o se forme una nueva generación de microalgas. Este proceso de aumento de biomasa se dio con una tasa de crecimiento de 0,459 por día y 0,663 divisiones diarias.

Los valores para los parámetros de crecimiento (Tabla 5) obtenidos en el presente estudio fueron similares a los valores alcanzado al iniciar un cultivo con la misma concentración celular de *Scenedesmus*, donde se obtuvo una tasa de crecimiento de 0,448 día<sup>-1</sup>, 0,646 divisiones diarias y un tiempo generacional de 1,546 días (Latiffi et al., 2017). Y se obtuvo mejores resultados en comparación a valores de 0,345 día<sup>-1</sup> y 0,148 día<sup>-1</sup> para la tasa de crecimiento; 0,497 y 0,213 divisiones por día; y al tiempo necesario para duplicación, que fue menor frente a los de 2,003 y 4,683 días obtenidos en dos estudios realizados para esta especie de microalga (Dixit et al., 2020; Gour et al., 2016).

Después del periodo de cultivo de *Scenedesmus* se logró obtener aproximadamente 6 g de biomasa por litro, la cual fue secada y presentó un rendimiento del 25% al proporcionar 1,5 g de peso seco por litro (DW/L). Este valor de biomasa representa una cantidad elevada en comparación a 0,25 g DW/L alcanzados en 18 días en un estudio de evaluación del potencial de la microalga para producción de biocombustibles (Gour et al., 2016); o frente a los 0,70 g DW/L obtenidos como mejor resultado en la evaluación de producción de biomasa para la industria de procesamiento de aguas (Latiffi et al., 2017).

Durante todo el periodo de crecimiento microalgal en el medio a base de BASFOLIAR se suministró iluminación y aireación constante, y se monitoreó la temperatura y la coloración del cultivo, esto permitió alcanzar una cinética de crecimiento competente y una producción de biomasa elevada. Con el fertilizante utilizado se proporcionaron concentraciones adecuadas de nutrientes. **Cerón et al., (2018)** menciona que los nutrientes de mayor relevancia para los cultivos de microalgas son el nitrógeno y el fósforo, y el fertilizante utilizado presentaba un 10 y 4% de estos, respectivamente; lo cual contribuyó en el rápido desarrollo de las microalgas.

El fotoperiodo de 24:0 horas luz:oscuridad utilizado también contribuyó al rápido crecimiento del alga. El período continuo de exposición a la luz influye positivamente en el crecimiento y producción de biomasa de las microalgas, ya que son paralelos a la tasa de fotosíntesis y el metabolismo de las microalgas que se favorece bajo estas condiciones (**Lancheros-Díaz et al., 2021; Yusof et al., 2021**). De igual forma, la agitación continua suministrada mediante bombas de aire aseguró un crecimiento propicio al permitir la distribución homogénea de células y nutrientes, mejorar la distribución de la luz a las células, evitar la sedimentación de las microalgas y suministrar diariamente CO<sub>2</sub> a partir del aire filtrado (**Mariano et al., 2017**).

La temperatura también es un factor influyente en el desarrollo de las microalgas, el rango óptimo para *Scenedemus* está comprendido entre 20 y 40 °C; por lo que, al ser mantenida al ambiente del laboratorio de entre 20 – 25 °C, se logró un crecimiento apropiado de la microalga (**Papry et al., 2019**). Como indicador complementario del estado del cultivo se tomó la coloración verde de este, ya que muestra el estado del aparato fotosintético de la microalga que es muy sensible a cambios de temperatura y pH, por lo que permitió evaluar si el medioambiente se mantenía adecuado para el crecimiento de las células (**Bermejo et al., 2021**).

Optimizando las condiciones de cultivo de *Scenedemus* sp. se podría mejorar los parámetros de crecimiento de la microalga, ya que existen estudios que muestran que esta especie puede alcanzar tasas de crecimiento más altas, que



van desde 0,839 (Sarwa & Verma, 2017) hasta 2,84 (Rosen et al., 2022) por día; y una cantidad de biomasa seca que podría ser de hasta 2,369 g de peso seco/L (Rosen et al., 2022); valores altamente competitivos frente a los de ciertas especies de los géneros más cultivados en la actualidad: *Spirulina*, *Chlorella* y *Dunaliella* (Rosen et al., 2022; Soni et al., 2019; Wolf et al., 2021).

### 3.1.2 Extracción y caracterización de compuestos etanólicos y acuosos de *Scenedesmus* sp.

El proceso de extracción permite obtener metabolitos de microalgas como: fenoles, flavonoides, carotenoides, alcaloides, glucósidos y otros (García-Vaquero et al., 2021). El etanol es un solvente seguro para el consumo humano y se ha utilizado con éxito para extraer compuestos bioactivos de especies vegetales y de algas (Ermi Hikmawanti et al., 2021). El etanol y el agua son considerados disolventes verdes, y este último presenta rendimientos elevados al utilizarse como disolvente puro (Wong-Paz et al., 2020); por ello, para el presente estudio, se optó por mezclas de etanol y agua 80:20 y 50:50, y agua pura como disolventes.

La determinación de los compuestos fenólicos totales (TPC) se realizó en base a una curva estándar de ácido gálico, los resultados se expresaron como mg de GAE/g biomasa seca. El contenido promedio de fenoles totales que se muestra en la tercera columna de la tabla 6, fueron calculados en base a la ecuación de regresión lineal  $A_{750\text{ nm}} = 0,0027 [\text{GAE}] + 0,113$  ( $R^2 = 0,9989$ ). Mientras que, la determinación de flavonoides totales se realizó en base a una curva estándar de quercetina, los resultados se expresaron como mg de QE/g biomasa seca. El contenido promedio de flavonoides compuestos totales (TFC) que se muestra en la cuarta columna de la tabla 7, fueron calculados en base a la ecuación de regresión lineal  $A_{420\text{ nm}} = 0,0155 [\text{GAE}] - 0,0183$  ( $R^2 = 0,999$ ). Las curvas de calibración se encuentran en el ANEXO C.

**Tabla 6**

*Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos etanólicos y acuosos de Scenedesmus sp.*

<b>Disolvente</b>	<b>Relación biomasa/Volumen de disolvente</b>	<b>Fenoles totales (mg GAE/g)</b>	<b>Flavonoides totales (mg QE/g)</b>
Etanol 80%	1:10	17,58 ± 1,52 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,09 <sup>e, f</sup>
	1:20	21,82 ± 1,84 <sup>b</sup>	5,32 ± 0,26 <sup>b</sup>
	1:30	28,55 ± 1,83 <sup>a</sup>	7,53 ± 0,17 <sup>a</sup>
Etanol 50%	1:10	11,83 ± 0,901 <sup>c</sup>	1,19 ± 0,02 <sup>f, g</sup>
	1:20	16,95 ± 1,76 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,01 <sup>e</sup>
	1:30	18,18 ± 2,57 <sup>b</sup>	4,53 ± 0,34 <sup>c</sup>
Agua	1:10	6,64 ± 0,891 <sup>e</sup>	0,77 ± 0,01 <sup>g</sup>
	1:20	7,27 ± 1,771 <sup>c, d</sup>	1,98 ± 0,03 <sup>e</sup>
	1:30	11,37 ± 2,02 <sup>c, d</sup>	2,47 ± 0,02 <sup>d</sup>

*Nota:* Los resultados son los promedios ± desviación estándar.

a, b, c, d, e, f, g Valores con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento para la prueba de fenoles totales ( $p < 0,05$ ).

Con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que los dos factores analizados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de fenoles totales (mg GAE/g) y flavonoides totales (mg QE/g) extraídos con un 95,0% de nivel de confianza ( $p < 0,05$ ). El resultado del análisis estadístico se encuentra disponible en el ANEXO D.

En relación con el TPC y TFC de los extractos microalgales, en la tabla 6 se puede observar que bajo la combinación de etanol al 80% y la relación material microalgal/volumen de disolvente de 1:30 se alcanzó el promedio más alto. Esto se explica, ya que este proceso depende de la compatibilidad de la polaridad entre solvente y compuesto (Ermi Hikmawanti et al., 2021); por lo que, solventes polares como el etanol son favorables para la extracción de compuestos polares como fenoles y flavonoides.

Además, al presentar también una parte acuosa, se aumentó su polaridad y afinidad (Albert et al., 2022; Hapsari et al., 2022). Y, el agua también favoreció el hinchamiento de la biomasa microalgal para aumentar el área de superficie de contacto y así lograr una extracción más eficiente de estos metabolitos (Tsouko et al., 2019), un 20% de agua fue suficiente para favorecer este proceso en las células microalgales.

La superioridad del etanol al 80% frente al agua pura en la extracción de compuestos de *Scenedemus* sp. se ve afectada por el tipo polifenoles presentes en la microalga (Castellanos-Gallo et al., 2022). Con los resultados obtenidos se puede decir que la microalga poseía metabolitos con un rango de polaridad cercano a la del etanol acuoso 80% (v/v) (Curcuraci et al., 2022; Lohvina et al., 2022). Lo cual concuerda con observaciones realizadas en plantas y microalgas, donde se informa que los polifenoles suelen ser más solubles en disolventes menos polares que el agua (Sepahpour et al., 2018; Shanmugam et al., 2021).

Esta tendencia de mejor eficiencia de extracción de fenoles y flavonoides con mayor concentración de etanol es demostrada en diversos estudios (Anwer et al., 2022; Bellahcen et al., 2020; Bulut et al., 2019; Vicente et al., 2021); a pesar de ello, existe evidencia de que, con aumento del tiempo de extracción (24 horas) o de temperatura (80 °C), el agua pura puede llegar a extraer más compuestos fenólicos y flavonoides (hasta 58,63 mg GAE/g y 70,34 mg QE/g) (Cengiz Sahin, 2019; Patil & Kaliwal, 2019). Así mismo, el uso de estos mismos disolventes como fluidos supercríticos podría ayudar a alcanzar valores de hasta 59,25 mg GAE/g (Gilbert-López et al., 2017).

Respecto a la influencia de la relación biomasa – solvente en la extracción, se observa que mientras aumenta el volumen de solvente, aumenta la cantidad de los compuestos de interés en los extractos (1:30>1:20>1:10). Esto se dio debido a que, con mayor volumen de disolvente se aumenta el área de contacto con la biomasa, lo que permitió una mejor penetración en las microalgas para que liberen más metabolitos y así se transfieran los fenoles y flavonoides de manera más sencilla en el solvente (Esquivel-Hernández et al., 2017; Tsouko et al.,

2019). Varios autores encontraron que mientras se aumenta la cantidad de disolvente aumenta el CPT y CFT, sustentando los hallazgos del presente estudio (Ardiles et al., 2020; e Silva et al., 2018).

El promedio más elevado de TPC y TFC fue de 28,55 mg GAE/g DW y 7,53 mg QE/g DW, valores superiores a 24,70 mg GAE/g DW (Da Silva et al., 2021); 23 mg GAE/g DW y 8 mg QE/g DW (Mukherjee et al., 2022); 20,58 mg GAE/g DW (Patil & Kaliwal, 2019); y 5,40 mg GAE/g DW y 1,61 mg QE/g DW (Bulut et al., 2019) reportados para extractos etanólicos en diferentes estudios para *Scenedemus*.

Así también, se alcanzó valores cercanos a los reportados para otras especies de microalgas en extractos etanólicos: 41.53 mg GAE/g DW y 19,82 mg QE/g DW para *Nannochloropsis gaditana* (Kherraf et al., 2017); 26 mg GAE/g DW y 10,25 mg CE/g DW *Spirulina platensis* (da Silva et al., 2017); y 17,4 mg GAE/g DW y 17,3 mg QE/g DW para *Chlorella* sp. (Hussein et al., 2020).

La determinación de los carotenoides totales se realizó en base a las ecuaciones de Lichtenthaler (Bulut et al., 2019), usando las absorbancias obtenidas en tres longitudes de onda (470, 652 y 665 nm). Los resultados se muestran en la tabla 7, y están expresados en miligramos de carotenoides totales por gramo de biomasa seca.

**Tabla 7**

*Contenido de carotenoides totales en los extractos etanólicos y acuosos de Scenedesmus sp.*

Disolvente	Relación biomasa/Volumen de disolvente	Carotenoides totales (mg/g)
Etanol 80%	1:10	0,11 ± 0,01 <sup>c, d</sup>
	1:20	0,27 ± 0,01 <sup>b</sup>
	1:30	0,66 ± 0,01 <sup>a</sup>
Etanol 50%	1:10	0,06 ± 0,01 <sup>e</sup>
	1:20	0,09 ± 0,03 <sup>d, e</sup>
	1:30	0,24 ± 0,02 <sup>b</sup>

Disolvente	Relación biomasa/Volumen de disolvente	Carotenoides totales (mg/g)
Agua	1:10	0,01 ± 0,01 <sup>f</sup>
	1:20	0,07 ± 0,01 <sup>e</sup>
	1:30	0,14 ± 0,02 <sup>c</sup>

*Nota:* Los resultados son los promedios ± desviación estándar.

a, b, c, d, e, f Valores con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas entre disolvente y relación material microalgal/disolvente para la prueba de carotenoides totales ( $p < 0,05$ ).

El análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey también mostraron que los dos factores analizados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la cantidad de carotenoides (mg/g) extraídos con un 95,0% de nivel de confianza ( $p < 0,05$ ). El resultado del análisis estadístico se encuentra disponible en el ANEXO D.

El mayor contenido de carotenoides totales se muestra en el etanol al 80% y la mejor relación de material microalgal/volumen de disolvente es de 1:30 al igual que para fenoles y flavonoides. Esto es debido a que los carotenoides y pigmentos presentes en *Scenedesmus* sp. son muy poco solubles en agua (Damergi et al., 2017; Kholany et al., 2022). Estos resultados se sustentan en otros estudios, donde los carotenoides de diferentes tipos de microalgas son mucho más solubles al añadir solventes orgánicos de baja polaridad (Bulut et al., 2019; Gabr et al., 2020; Hussein et al., 2020; Li et al., 2022).

El promedio más alto de carotenoides fue de 0,660 mg/g DW, este ingresa dentro del rango de los valores reportados por otros autores para diferentes microalgas (Bulut et al., 2019; Damergi et al., 2017; Haoujar et al., 2019; Rajput et al., 2021); sin embargo, la cantidad de carotenoides obtenidos en extractos etanólicos, tanto en este como en otros estudios, es menor al comparar con extracciones realizadas con solventes como el hexano, éter de petróleo o cloroformo, que son solventes no polares. Además, dado que el proceso de secado fue a través de aire caliente, este pudo haber afectado el contenido de

estos pigmentos, ya que se pueden degradar fácilmente cuando la biomasa es secada con luz solar o con aire caliente (Park et al., 2018).

### 3.1.3 Actividades biológicas

#### 3.1.3.1 Actividad antioxidante evaluada por el método DPPH

La actividad antioxidante de los extractos se determinó mediante el ensayo de actividad captadora de radicales libres DPPH. Los resultados de la capacidad antioxidante de *Scenedesmus* sp. se dan en la Tabla 8 como porcentajes de actividad de eliminación o inhibición de radicales DPPH, así como micromoles Trolox por gramo de peso seco ( $\mu\text{mol}$  de TE/g DW) de microalgas.

**Tabla 8**

*Capacidad antioxidante determinada por el método DPPH de los extractos etanólicos y acuosos de Scenedesmus sp.*

Disolvente	Relación biomasa/Volumen de disolvente	Inhibición de radicales DPPH (%)	$\mu\text{mol}$ Trolox/g DW
Etanol 80%	1:10	$30,18 \pm 1,46^{b,c}$	$3,00 \pm 0,15^{c,d}$
	1:20	$32,71 \pm 3,57^b$	$3,26 \pm 0,38^c$
	1:30	$41,40 \pm 1,21^a$	$6,37 \pm 0,21^a$
Etanol 50%	1:10	$20,01 \pm 3,12^d$	$0,92 \pm 0,16^f$
	1:20	$25,01 \pm 1,39^{c,d}$	$2,46 \pm 0,15^d$
	1:30	$26,61 \pm 0,86^c$	$4,29 \pm 0,16^b$
Agua	1:10	$7,97 \pm 2,72^e$	$0,32 \pm 0,14^g$
	1:20	$9,51 \pm 0,69^e$	$0,84 \pm 0,07^{f,g}$
	1:30	$12,42 \pm 1,52^e$	$1,74 \pm 0,24^e$

*Nota:* Los resultados son los promedios  $\pm$  desviación estándar.

a, b, c, d, e, f, g Valores con letras diferentes en la misma columna presentan diferencias estadísticamente significativas entre disolvente y relación material microalgal/disolvente sobre la actividad antioxidante ( $p < 0,05$ ).

Con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que los dos factores analizados tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad antioxidante de los extractos (porcentaje de

inhibición de radicales DPPH y  $\mu\text{mol Trolox/g DW}$ ) con un 95,0% de nivel de confianza ( $p < 0,05$ ). El resultado del análisis estadístico se encuentra disponible en el ANEXO E.

El ensayo DPPH mide la capacidad reductora de los antioxidantes probados hacia el radical DPPH, ya sea por reducción directa a través de la transferencia de electrones o por eliminación de radicales por transferencia de átomos de hidrógeno (**Ermi Hikmawanti et al., 2021**). Todos los extractos obtenidos de *Scenedesmus* sp. demostraron capacidades para neutralizar el efecto oxidativo de los radicales DPPH (Tabla 8). Esta actividad antioxidante también se demostró en especies de microalgas marinas y de agua dulce investigadas en todo el mundo (**Coulombier et al., 2020; Gauthier et al., 2020; Kumar et al., 2022; Monteiro et al., 2020; Mousavian et al., 2022**).

Los porcentajes de inhibición más altos fueron encontradas en los extractos obtenidos con el disolvente etanol 80%, y el mejor resultado se alcanzó con la relación biomasa:volumen de disolvente 1:30. Estos resultados estuvieron de acuerdo con lo reportado por otros estudios, donde se ha demostrado que extractos obtenidos con solventes de polaridad intermedia muestran una mayor capacidad de captación del radical DPPH en comparación con los polares y no polares (**Bulut et al., 2019; Matsuo et al., 2020; Nawaz et al., 2020**).

De acuerdo con los resultados de caracterización de los extractos (Tabla 6 y 7), la alta cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides presentes en el extracto hidrometanólico pueden relacionarse con una actividad antioxidante significativa. Lo cual concuerda con lo establecido por **Banskota et al., (2018)**, quien menciona que los carotenoides y los fenoles son dos grupos principales de compuestos naturales que tienen una fuerte actividad antioxidante.

Diversos estudios muestran que existe una relación positiva entre el contenido de fenoles y flavonoides con la actividad antioxidante (**Banskota et al., 2018; Mukherjee et al., 2022; Trentin et al., 2022**), esto sugiere que la capacidad de eliminación de radicales del extracto podría estar relacionada con la alta concentración de grupos hidroxilo (**Kumar et al., 2022**). Los grupos hidroxilo fenólicos pueden proporcionar una mayor capacidad para donar átomos de

hidrógeno o electrones y estabilizar el radical, por lo que el número y la posición de los estos estará directamente relacionada con su capacidad antioxidante (**Ermi Hikmawanti et al., 2021; Mercado-Mercado et al., 2020**).

De manera similar, los carotenoides muestran correlaciones positivas con la actividad antioxidante (**Park et al., 2018**). Los carotenoides también son capaces de eliminar radicales con la transferencia de electrones o de átomos de hidrogeno (**Milani et al., 2017**); por lo que, aunque es bajo el contenido de estos compuestos en los extractos de *Scenedesmus* sp., pueden también haber contribuido para alcanzar el máximo porcentaje de reducción del DPPH.

La formación de todos estos compuestos bioactivos pudo haber sido inducida como una estrategia fotoprotectora frente al estrés luminoso causado por el periodo de exposición (24:0 h, luz: oscuridad) (**Faraloni et al., 2021**). La iluminación constante promueve la síntesis de varios compuestos bioactivos que desempeñan un papel fundamental en la eliminación y supresión del desarrollo de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por este tipo de estrés (**Faraloni et al., 2021; Goiris et al., 2012; Yusof et al., 2021**).

De acuerdo con los datos obtenidos por el ensayo DPPH, la mayor capacidad antioxidante de los extractos se midió con  $6,37 \pm 0,14$   $\mu\text{mol}$  de TE/g DW con un porcentaje de inhibición de 41,40%, valor superior al de 25,65% alcanzado por **Bulut et al., (2019)** con 3,71  $\mu\text{mol}$  de TE/g DW para extractos de *Scenedesmus* sp. obtenidos con etanol al 75% como solvente.

De igual forma, el valor alcanzado en el presente estudio fue superior al alcanzado con una extracción con metanol, donde se obtuvo un porcentaje de actividad antioxidante de 15.25% (**Arguelles, 2018**). Sin embargo, el porcentaje alcanzado es menor al reportado por **Patil & Kaliwal, (2019)** de 72,42% en un extracto etanólico concentrado; los tres estudios muestran la misma tendencia de mayor actividad antioxidante en extractos obtenidos con mayor grado alcohólico respecto a extractos acuosos.

Además, el porcentaje de inhibición alcanzado en el presente estudio es similar al de otras especies de algas comercialmente cultivadas; por ejemplo, se ha



obtenido un porcentaje de inhibición de 62.46% para *Spirulina platensis* (Taghavi-Takyar et al., 2019), 30.06% para *Chlorella* sp. (Dimova et al., 2021), y 28,65% y 19,23% para *Nannochloropsis* sp. y *Dunaliella tertiolecta* con extractos etanólicos (Norzagaray-Valenzuela et al., 2016). De igual forma, esta capacidad antioxidante es cercana a la reportada para especies vegetales y de macroalgas (Albert et al., 2022; Dimova et al., 2021; Lohvina et al., 2022; Monteiro et al., 2020; Osei Akoto et al., 2020).

### 3.1.3.2 Actividad antiinflamatoria evaluada por el método de desnaturalización de proteínas

Se determinó la actividad antiinflamatoria del diclofenaco de sodio como fármaco estándar y del extracto que presentó la actividad antioxidante más elevada, es decir, del extracto hidroetanólico (etanol:agua 80:20). Los resultados se muestran en la Tabla 9, y se expresaron como el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de la albúmina.

**Tabla 9**

*Actividad antiinflamatoria del extracto hidroetanólico (etanol-agua 80:20) de Scenedesmus sp. y del diclofenaco de sodio evaluada por el método de desnaturalización de proteínas.*

Muestra	Concentración (µg/mL)			
	100	200	500	1000
Diclofenaco	34,97 ± 2,43 <sup>a</sup>	62,21 ± 1,49 <sup>b</sup>	85,94 ± 1,41 <sup>c</sup>	95,76 ± 0,89 <sup>d</sup>
Extracto microalgal	4,33 ± 1,22 <sup>a</sup>	11,31 ± 2,44 <sup>b</sup>	20,19 ± 2,45 <sup>c</sup>	38,42 ± 2,17 <sup>d</sup>

*Nota:* Los resultados son los promedios ± desviación estándar.

a, b, c, d, e, f, g Valores con letras diferentes en la misma fila presentan diferencias estadísticamente significativas entre disolvente y relación material microalgal/disolvente sobre la actividad antioxidante ( $p < 0,05$ ).

Con el análisis de varianza ANOVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, se demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de inhibición de la desnaturalización entre las diferentes concentraciones de diclofenaco y del extracto hidroetanólico con un 95,0% de nivel de confianza ( $p < 0,05$ ). El resultado del análisis estadístico se encuentra disponible en el ANEXO F.

La desnaturalización de las proteínas es una causa bien documentada de la inflamación y artritis reumatoide. Por lo que, con este ensayo se evaluó la capacidad del extracto de *Scenedesmus* sp. para reducir la desnaturalización térmica de la proteína albúmina, que vendría a ser un factor que contribuye a su actividad antiinflamatoria (**Fernandes & Cordeiro, 2021**). El extracto microalgal indujo un efecto antiinflamatorio en todas las concentraciones analizadas.

El máximo porcentaje de inhibición de la desnaturalización alcanzado fue de 38,78%, mientras que el del fármaco estándar utilizado como control positivo fue de 95,72%, ambos a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Se utilizó el diclofenaco de sodio, ya que es un potente fármaco no esteroideo (AINE), y como la mayoría de este tipo de fármacos, posee la capacidad intrínseca de estabilizar o prevenir la desnaturalización de la albúmina tratada térmicamente a un pH fisiológico de 6,2–6,5 (**Aidoo et al., 2021**).

El mecanismo de desnaturalización está involucrado en la alteración de la fuerza electrostática de los enlaces de hidrógeno, hidrófobos y disulfuro (**Khalid et al., 2021**). Y varios compuestos como: fenoles, flavonoides, glucósidos, carotenoides, terpenoides y esteroides exhiben una capacidad mediadora que reduce el impacto de estos procesos desnaturalizantes (**Osei Akoto et al., 2020**); por lo que, el extracto microalgal, al presentar una notable cantidad de estos compuestos, exhibe una considerable actividad antiinflamatoria.

El porcentaje de inhibición de desnaturalización de la albúmina de 38,78% alcanzado con el extracto hidroetanólico de *Scenedesmus* sp. es superior a los alcanzados con etanol y agua (21,65 y 30,45%, respectivamente) (**Patil &**

**Kaliwal, 2019**); esto demuestra que la mezcla de estos disolventes es capaz de extraer más compuestos antiinflamatorios de esta microalga. Este porcentaje además es cercano al de 47%, alcanzado con compuestos de *Spirulina* (**Prabakaran et al., 2020**). O a los valores de 32; 34,7; 65,9 y 72,23% reportados para especies vegetales utilizando este método de desnaturalización de proteínas (**Dharmadeva et al., 2018; I. Henneh et al., 2018; I. T. Henneh et al., 2018; Osei Akoto et al., 2020**).

### **3.2 Verificación de la hipótesis**

En base a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alternativa, indicando que los extractos hidroetanólicos y acuosos de la microalga *Scenedesmus* sp. de origen ecuatoriano presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Los compuestos producidos por *Scenedesmus* sp. mostraron actividad antioxidante y antiinflamatoria, lo que demuestra que estos microorganismos tienen potencial para ser aplicados en la producción de moléculas bioactivas naturales. Además, dado que esta microalga presentó una alta capacidad adaptativa, tuvo requerimientos mínimos para un rápido crecimiento, y su producción a escala comercial requeriría de infraestructura de baja tecnología sin necesidad de tierra cultivable, podría incluso reemplazar a las plantas para uso industrial en esta rama de producción.
- Se logró obtener 6 gramos de biomasa de *Scenedesmus* sp. por litro, en un medio de bajo costo elaborado a partir del fertilizante BASFOLIAR (10:4:7) y agua. La competente cinética de crecimiento que mostró esta microalga permitió lograr altas concentraciones celulares; esto fue favorecido por las condiciones de cultivo como el fotoperiodo 24:0 horas luz:oscuridad, la temperatura (22 – 25 °C) y la aireación constante.
- Todos los extractos obtenidos a partir de la biomasa seca de *Scenedesmus* sp. mostraron fenoles, flavonoides y carotenoides. El extracto obtenido con el disolvente etanol:agua (80:20 v/v) y la relación material microalgal/volumen de disolvente 1:30 fue el que presentó la mayor cantidad de estos compuestos (28,55 mg GAE/g, 7,53 mg QE/g y 0,66 mg de carotenoides/g); mientras que, el extracto acuoso y la relación 1:10 fue el que mostró los más bajos resultados. La alta cantidad de estos compuestos pudo haber sido favorecida por la iluminación constante, estrés que puede incrementar la síntesis de estos metabolitos como un mecanismo fotoprotector.
- Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* mediante la capacidad de inhibición del radical DPPH para todos los extractos microalgales. El mayor porcentaje de inhibición y micromoles Trolox por gramo de peso seco

(41,40% y 6,37  $\mu\text{mol TE/g DW}$ ) se alcanzó con el extracto hidroetanólico rico en fenoles, flavonoides y carotenoides; lo que demuestra que estos compuestos contribuyen a la actividad antioxidante. El porcentaje de inhibición alcanzado es competitivo frente a los alcanzados por otras microalgas actualmente cultivadas, por lo que *Scenedesmus* sp. es una especie muy prometedora para la producción de compuestos antioxidantes.

- Se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Scenedesmus* sp. mediante su capacidad para inhibir la desnaturalización de la albúmina, obteniéndose el mayor porcentaje de inhibición con la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (38,78 %). Muchas de las enfermedades inflamatorias se asocian con la desnaturalización de las proteínas; por lo tanto, valdría la pena considerar cualquier agente que pueda prevenir la desnaturalización de proteínas, como los compuestos obtenidos a partir de *Scenedesmus* sp., para el desarrollo de fármacos antiinflamatorios.

## 5.2 Recomendaciones

- Extender el estudio a otras actividades biológicas que puedan presentar los compuestos bioactivos de la microalga *Scenedesmus* sp.
- Evaluar la viabilidad de otras técnicas de cosecha de biomasa que permitan optimizar el tiempo y escalar el proceso.
- Integrar y complementar los procesos de extracción para alcanzar un mejor rendimiento, ya que estas microalgas tienen la capacidad de formar colonias, lo que pudo haber afectado la eficiencia de extracción.
- Identificar los metabolitos secundarios obtenidos en el extracto rico en compuestos fenólicos, flavonoides y carotenoides.
- Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria con métodos *in vivo*, para sustentar y complementar los resultados obtenidos en la presente investigación con representaciones de procesos fisiológicos.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### Referencias Bibliográficas

- Acurio-Méndez, S., & Arciniegas-Solarte, K. (2015). Evaluación de la remoción de Nitritos y nitratos en muestras de agua del Río San Pedro cantón Rumiñahui por microalgas clorofitas. [Tesis de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/9407>
- Aidoo, D. B., Konja, D., Henneh, I. T., & Ekor, M. (2021). Protective Effect of Bergapten against Human Erythrocyte Hemolysis and Protein Denaturation *in vitro*. *International Journal of Inflammation*, 2021(1). 7 páginas. <https://doi.org/10.1155/2021/1279359>
- Albert, C., Codină, G. G., Héjja, M., András, C. D., Chetrariu, A., & Dabija, A. (2022). Study of Antioxidant Activity of Garden Blackberries (*Rubus fruticosus* L.) Extracts Obtained with Different Extraction Solvents. *Applied Sciences*, 12(8), 4004. <https://doi.org/10.3390/APP12084004>
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*, 44(3), Artículo e13145. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13145>
- Amarowicz, R., & Pegg, R. B. (2019). Natural antioxidants of plant origin. En F. Toldrá (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research*, (pp. 1–81). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.011>
- Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2018). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 59(12), 1880–1902. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>
- Andrade, A., Hort, M. A., Schimith, L. E., Peraza, G. G., Maria, L. da S., Soares, M. C. F., Giroldo, D., & Muccillo-Baisch, A. L. (2021). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of cellular and extracellular extracts from microalga *Chlamydomonas pumilioniformis* on mice. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 43(1), Artículo e52889.

<https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v43i1.52889>

- Anwar, H., Hussain, G., & Mustafa, I. (2018). Antioxidants from Natural Sources. En E. Shalaby, & G. M. Azzam (Eds.), *Antioxidants in Foods and Its Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.75961>
- Anwer, S. S., Sdiq, K. H., Muhammad, K. R., & Aladdin, L. M. (2022). Phenolic compound and fatty acid properties of some microalgae species isolated from Erbil City. *Brazilian Journal of Biology*, 82, Artículo e256927. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256927>
- Apandi, N. M., Gani, P., Sunar, N. M., Mohamed, R. M. S. R., AlGheethi, A., Apandi, A. M., Nagarajah, R., Shaari, N. A. R., Cheong, K., & Rahman, R. A. (2022). *Scenedesmus* sp. Harvesting by Using Natural Coagulant after Phycoremediation of Heavy Metals in Different Concentrations of Wet Market Wastewater for Potential Fish Feeds. *Sustainability* 2022, 14(9), 5090. <https://doi.org/10.3390/SU14095090>
- Apandi, N., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Gani, P., Ibrahim, A., & Kassim, A. H. M. (2019). *Scenedesmus* Biomass Productivity and Nutrient Removal from Wet Market Wastewater, A Bio-kinetic Study. *Waste and Biomass Valorization*, 10(10), 2783–2800. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0313-y>
- Ardiles, P., Cerezal-Mezquita, P., Salinas-Fuentes, F., Órdenes, D., Renato, G., & Ruiz-Domínguez, M. C. (2020). Biochemical composition and phycoerythrin extraction from red microalgae: A comparative study using green extraction technologies. *Processes*, 8(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/pr8121628>
- Arguelles, E. D. R. (2018). Proximate analysis, antibacterial activity, total phenolic content and antioxidant capacity of a green microalga *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*, 20(1), 150–158. <https://www.researchgate.net/publication/324490066>
- Ávila-Escalante, M. L., Coop-Gamas, F., Cervantes-Rodríguez, M., Méndez-Iturbide, D., & Aranda-González, I. I. (2020). The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases—Clinically controlled trials. *Journal of Food Biochemistry*, 44(5), Artículo e13191. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13191>



- Aziz, N., Kim, M. Y., & Cho, J. Y. (2018). Anti-inflammatory effects of luteolin: A review of *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 342–358. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.05.019>
- Baek, S. H., Cao, L., Jeong, S. J., Kim, H. R., Nam, T. J., & Lee, S. G. (2021). The Comparison of Total Phenolics, Total Antioxidant, and Anti-Tyrosinase Activities of Korean Sargassum Species. *Journal of Food Quality*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6640789>
- Balasubramaniam, V., Gunasegavan, R. D. N., Mustar, S., Lee, J. C., & Noh, M. F. M. (2021). Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae. *Molecules*, 26(4), 943. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26040943>
- Banskota, A. H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P. J., & O’Leary, S. J. B. (2018). Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *Journal of Applied Phycology* 2018, 31(1), 309–318. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1523-1>
- Bellahcen, T. O., Aamiri, A., Touam, I., Hmimid, F., Amrani, A. El, Cherif, A., & Cherki, M. (2020). Evaluation of Moroccan microalgae: *Spirulina platensis* as a potential source of natural antioxidants. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 17(3). <https://doi.org/10.1515/jcim-2019-0036>
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., & Dall’osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microb Cell Fact*, 17(1). Artículo e173. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
- Bermejo, E., Rayen, F., & Behnam, T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 41(4), 457–473. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1854672>
- Brito, D. J., Caña, E., Guevara, M., Subero, J., & Colivet, J. (2016). Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*. *Revista Bio Ciencias*, 4(1), 15–26. <https://doi.org/10.15741/revbio.04.01.02>
- Bulut, O., Akin, D., Sönmez, Ç., Öktem, A., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2019).

Phenolic compounds, carotenoids, and antioxidant capacities of a thermo-tolerant *Scenedesmus* sp. (Chlorophyta) extracted with different solvents. *Journal of Applied Phycology*, 31(3), 1675–1683. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1726-5>

Carneiro, M., Ranglová, K., Lakatos, G. E., Câmara Manoel, J. A., Grivalský, T., Kozhan, D. M., Toribio, A., Moreno, J., Otero, A., Varela, J., Malcata, F. X., Suárez Estrella, F., Ación-Fernández, F. G., Molnár, Z., Ördög, V., & Masojídek, J. (2021). Growth and bioactivity of two chlorophyte (*Chlorella* and *Scenedesmus*) strains co-cultured outdoors in two different thin-layer units using municipal wastewater as a nutrient source. *Algal Research*, 56(November 2020), Artículo e102299. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102299>

Castellanos-Gallo, L., Ballinas-Casarrubias, L., Espinoza-Hicks, J. C., Hernández-Ochoa, L. R., Muñoz-Castellanos, L. N., Zermeño-Ortega, M. R., Borrego-Loya, A., & Salas, E. (2022). Grape Pomace Valorization by Extraction of Phenolic Polymeric Pigments: A Review. *Processes*, 10(3), 469. <https://doi.org/10.3390/pr10030469>

Castillo-Jácome, D. & Viterí-Moya, J. (2019). Estudio del perfil de aminoácidos del huevo de gallina (*gallus domesticus*) y pre-diseño de una planta de producción de huevo líquido [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/20267>

Cengiz Sahin, S. (2019). *Scenedesmus obliquus*: A Potential Natural Source for Cosmetic Industry. *International Journal of Secondary Metabolite*, 6(2), 129–136. <https://doi.org/10.21448/ijsm.545771>

Cerón, L. E., Miramag, K. M., Fernández-Izquierdo, P., & Ortiz, F. L. (2018). Efecto de las variaciones de las fuentes de nitrógeno, fósforo y mezcla de micronutrientes en agua residual municipal para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(30), 121–128. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/163>

Chellamboli, C., & Perumalsamy, M. (2016). Synergistic Effect of Hormones and Biosolids on *Scenedesmus abundans* for Eliciting Total Biolipids. *Water*

*Environment Research*, 88(12), 2180–2190.  
<https://doi.org/10.2175/106143016X14733681695681>

Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Antheaume, C., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2020). Impact of Light Intensity on Antioxidant Activity of Tropical Microalgae. *Marine Drugs*, 18(2), 122.  
<https://doi.org/10.3390/MD18020122>

Curcuraci, E., Manuguerra, S., Messina, C. M., Arena, R., Renda, G., Ioannou, T., Amato, V., Hellio, C., Barba, F. J., & Santulli, A. (2022). Culture Conditions Affect Antioxidant Production, Metabolism and Related Biomarkers of the Microalgae *Phaeodactylum tricornutum*. *Antioxidants*, 11(2), 411.  
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX11020411>

da Silva, M. F., Casazza, A. A., Ferrari, P. F., Aliakbarian, B., Converti, A., Bezerra, R. P., Porto, A. L. F., & Perego, P. (2017). Recovery of phenolic compounds of food concern from *Arthrospira platensis* by green extraction techniques. *Algal Research*, 25, 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.027>

Dahlin, L. R., Van Wychen, S., Gerken, H. G., McGowen, J., Pienkos, P. T., Posewitz, M. C., & Guarnieri, M. T. (2018). Down-selection and outdoor evaluation of novel, halotolerant algal strains for winter cultivation. *Frontiers in Plant Science*, 871, Artículo e1513. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01513>

Damergi, E., Schwitzguébel, J.-P., Refardt, D., Sharma, S., Holliger, C., & Ludwig, C. (2017). Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. *Algal Research*, 25, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.003>

Danraka, R., Salaudeen, M., Maje, I., & Ejiofor, J. I. (2021). Anti-inflammatory Activity of Ethanol Leaf Extract of *Hymenodictyon Floribundum* (Hochst. & Steud) B. L. Rob in Rats: Impact of Inflammatory Biomarkers. *The FASEB Journal*, 35(S1). <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.2021.35.S1.00373>

de Farias-Neves, F., Demarco, M., & Tribuzi, G. (2020). Drying and Quality of Microalgal Powders for Human Alimentation. En M. Vítová (Ed.), *Microalgae - From Physiology to Application*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.89324>

- Del Mondo, A., Smerilli, A., Ambrosino, L., Albini, A., Noonan, D. M., Sansone, C., & Brunet, C. (2021). Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. In *Critical Reviews in Biotechnology* 41(2), 155–171. Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284>
- Dharmadeva, S., Galgamuwa, L. S., Prasadinie, C., & Kumarasinghe, N. (2018). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. *Ayu*, 39(4), 239-242. [https://doi.org/10.4103/AYU.AYU\\_27\\_18](https://doi.org/10.4103/AYU.AYU_27_18)
- Dimova, D., Dobreva, D., Panayotova, V., & Makedonski, L. (2021). DPPH antiradical activity and total phenolic content of methanol and ethanol extracts from macroalgae (*Ulva rigida*) and microalgae (*Chlorella*). *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 6(2), 37. <https://doi.org/10.14748/ssp.v7i2.7369>
- Dixit, R., Singh, S., & Singh, A. (2020). Effect of nitrogen deficiency on the physiology and biochemical composition of microalga *Scenedesmus rotundus*-MG910488. *Journal of Basic Microbiology*, 60(2), 158–172. <https://doi.org/10.1002/JOBM.201900383>
- e Silva, A., Teixeira, W., Laís, M., Ponte, M., & Bastos, A. (2018). Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using the concept of green chemistry. *Algal Research*, 35, 178–184. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.08.015>
- Ermi Hikmawanti, N. P., Fatmawati, S., & Asri, A. W. (2021). The Effect of Ethanol Concentrations as The Extraction Solvent on Antioxidant Activity of Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Leaves Extracts. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 755(1), Arrtículo e012060. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/755/1/012060>
- Esquivel-Hernández, D. A., Ibarra-Garza, I. P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Rostro-Alanis, M. de J., Alemán-Nava, G. S., García-Pérez, J. S., & Parra-Saldívar, R. (2017). Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Bioproducts and Biorefining* 11(1), 215–231. <https://doi.org/10.1002/bbb.1735>

- Faraloni, C., Di Lorenzo, T., & Bonetti, A. (2021). Impact of light stress on the synthesis of both antioxidants polyphenols and carotenoids, as fast photoprotective response in *Chlamydomonas reinhardtii*: New prospective for biotechnological potential of this microalga. *Symmetry*, *13*(11), 2220. <https://doi.org/10.3390/sym13112220>
- Fernandes, T., & Cordeiro, N. (2021). Microalgae as Sustainable Biofactories to Produce High-Value Lipids: Biodiversity, Exploitation, and Biotechnological Applications. *Marine Drugs*, *19*(10), 573. <https://doi.org/10.3390/md19100573>
- Gabr, G. A., El-Sayed, S. M., & Hikal, M. S. (2020). Antioxidant Activities of Phycocyanin: A Bioactive Compound from *Spirulina platensis*. *Journal of Pharmaceutical Research International*, *32*(2), 73–85. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i230407>
- Gallego, R., Valdés, A., Sánchez-Martínez, J. D., Suárez-Montenegro, Z. J., Ibáñez, E., Cifuentes, A., & Herrero, M. (2021). Study of the potential neuroprotective effect of *Dunaliella salina* extract in SH-SY5Y cell model. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1–15. <https://doi.org/10.1007/S00216-021-03819-1>
- Garcia-Vaquero, M., Ravindran, R., Walsh, O., O’doherly, J., Jaiswal, A. K., Tiwari, B. K., & Rajauria, G. (2021). Evaluation of Ultrasound, Microwave, Ultrasound–Microwave, Hydrothermal and High Pressure Assisted Extraction Technologies for the Recovery of Phytochemicals and Antioxidants from Brown Macroalgae. *Marine Drugs* 2021, *19*(6), 309. <https://doi.org/10.3390/MD19060309>
- Gauthier, M. R., Senhorinho, G. N. A., & Scott, J. A. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, *52*, Artículo e102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Gilbert-López, B., Mendiola, J. A., van den Broek, L. A. M., Houweling-Tan, B., Sijtsma, L., Cifuentes, A., Herrero, M., & Ibáñez, E. (2017). Green compressed fluid technologies for downstream processing of *Scenedesmus obliquus* in a biorefinery approach. *Algal Research*, *24*, 111–121. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2017.03.011>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L.

- (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gonçalves, R., Frazão, A., Pedrosa, R., Viana Marques, D. de A., Amaro, V., Tavares, S., de Lima Filho, J. L., Porto, & Figueiredo, A. L. (2019). Hydrogel-based *Chlorella vulgaris* extracts: a new topical formulation for wound healing treatment. *Journal of Applied Phycology* 2019, 31(6), 3653–3663. <https://doi.org/10.1007/S10811-019-01837-2>
- Gonzalez-Fernandez, C., & Muñoz, R. (2017). Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products. Woodhead. <https://books.google.com.ec/books?hl=en&lr=&id=RQ8TDgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq>
- Gour, R. S., Chawla, A., Singh, H., Chauhan, R. S., & Kant, A. (2016). Characterization and Screening of Native *Scenedesmus* sp. Isolates Suitable for Biofuel Feedstock. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0155321>
- Guclu, G., Kelebek, H., & Selli, S. (2020). Antioxidant activity in olive oils. En V. Preedy R. Roos (Eds.), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 313–325). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819528-4.00031-6>
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02689-3>
- Guzik, U., & Wojcieszynska, D. (2019). Biodegradation of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and Their Influence on Soil Microorganisms. Kumar, A., Sharma, S. (eds), *Microbes and Enzymes in Soil Health and Bioremediation. Microorganisms for Sustainability* (pp. 379–401). Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-9117-0\\_16](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9117-0_16)
- Haoujar, I., Cacciola, F., Abrini, J., Mangraviti, D., Giuffrida, D., El Majdoub, Y. O., Kounnoun, A., Miceli, N., Taviano, M. F., Mondello, L., Rigano, F., & Senhaji, N. S. (2019). The Contribution of Carotenoids, Phenolic Compounds, and

Flavonoids to the Antioxidative Properties of Marine Microalgae Isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules* 2019, 24(22), Artículo e4037. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24224037>

Hapsari, S., Yohed, I., Kristianita, R. A., Jadid, N., Aparamarta, H. W., & Gunawan, S. (2022). Phenolic and flavonoid compounds extraction from *Calophyllum inophyllum* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), Artículo e103666. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.103666>

Henneh, I., Akrofi, R., Ameyaw, E., Konja, D., Owusu, G., Abane, B., Acquah-Mills, J., Edzeameh, F., & Tayman, F. (2018). Stem Bark Extract of *Sterculia setigera* Delile Exhibits Anti-inflammatory Properties through Membrane Stabilization, Inhibition of Protein Denaturation and Prostaglandin E2 Activity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 22(5), 1–11. <https://doi.org/10.9734/JPRI/2018/42030>

Henneh, I. T., Ameyaw, E. O., Biney, R. P., & Armah, F. (2018). *Ziziphus abyssinica* hydro-ethanolic root bark extract attenuates acute inflammation possibly through membrane stabilization and inhibition of protein denaturation and neutrophil de. *West African Journal of Pharmacy*, 29(2), 81–94. <https://www.researchgate.net/publication/328343306>

Hosseinizand, H., Sokhansanj, S., & Lim, C. J. (2017). Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics, 36(9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>

Hotos, G. N. (2021). Culture growth of the cyanobacterium phormidium sp. In various salinity and light regimes and their influence on its phycocyanin and other pigments content. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/jmse9080798>

Hussein, H. A., Syamsumir, D. F., Radzi, S. A. M., Siong, J. Y. F., Zin, N. A. M., & Abdullah, M. A. (2020). Phytochemical screening, metabolite profiling and enhanced antimicrobial activities of microalgal crude extracts in co-application with silver nanoparticle. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S40643-020-00322-W>

- Izadi, M., & Fazilati, M. (2018). Extraction and purification of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. *Asian Journal of Green Chemistry*, 2(4), 364–379. <https://doi.org/10.22034/AJGC.2018.63597>
- Kamble, P., Cheriyaundath, S., Lopus, M., & Sirisha, V. L. (2018). Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology* 2018, 30(3), 1641–1653. <https://doi.org/10.1007/S10811-018-1397-2>
- Kapoor, S., Singh, M., Srivastava, A., Chavali, M., Chandrasekhar, K., & Verma, P. (2021). Extraction and characterization of microalgae-derived phenolics for pharmaceutical applications: A systematic review. *Journal of Basic Microbiology* 2021. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202100458>
- Kaurinovic, B., & Vastag, D. (2019). Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. En E. Shalaby (Ed.), *Antioxidants*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.83731>
- Khalid, M., Alqarni, M. H., Shoaib, A., Arif, M., Foudah, A. I., Afzal, O., Ali, A., Ali, A., Alqahtani, S. S., & Altamimi, A. S. A. (2021). Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Potential of *Spondias mangifera* Extract Fractions: An *in silico*, *in vitro* and *in vivo* Approach. *Plants*, 10(5), 825. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10050825>
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0879-X>
- Kherraf, A., Tehami, W., Boufeldja, W., Yahla, I., Dra, G. A., Mansour, I. F. Z., & Benali, M. (2017). Determination of the nutritional and functional metabolites of *Nanochloropsis gaditana* produced in Algeria and evaluation of its antioxidant activity. *South Asian Journal of Experimental Biology*, 7(1), 13–20. [https://doi.org/10.38150/sajeb.7\(1\).p13-20](https://doi.org/10.38150/sajeb.7(1).p13-20)
- Kholany, M., Coutinho, J. A. P., & Ventura, S. P. M. (2022). Carotenoid Production from Microalgae: The Portuguese Scenario. *Molecules*, 27(8), 2540.



<https://doi.org/10.3390/molecules27082540>

- Khumalo, G. P., Van Wyk, B. E., Feng, Y., & Cock, I. E. (2022). A review of the traditional use of southern African medicinal plants for the treatment of inflammation and inflammatory pain. *Journal of Ethnopharmacology*, 283, Artículo e114436. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114436>
- Kumar, A., Ramamoorthy, D., Verma, D. K., Kumar, A., Kumar, N., Kanak, K. R., Marwein, B. M., & Mohan, K. (2022). Antioxidant and phytonutrient activities of *Spirulina platensis*. *Energy Nexus*, 6, Artículo e100070. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100070>
- Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Villaró, S., Morillas-España, A., & Ación, G. (2021). Industrial production of *Spirulina* as a protein source for bioactive peptide generation. *Trends in Food Science & Technology*, 116, 176–185. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.07.018>
- Lancheros-Díaz, A. G., Camacho-Kurmen, J. E., & Díaz Barrera, L. E. (2021). Producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L. *Nova*, 19(37), 99–119. <https://doi.org/10.22490/24629448.5498>
- Latiffi, N. A. A., Radin Mohamed, R. M. S., Apandi, N. M., & Tajuddin, R. M. (2017). Preliminary Assessment of Growth Rates on Different Concentration of Microalgae *Scenedesmus* sp. in Industrial Meat Food Processing Wastewater. *MATEC Web of Conferences*, 103, 06010. <https://doi.org/10.1051/matecconf/201710306010>
- Lee, S. H., Choi, S. H., Lee, I. S., Kim, Y., An, E. J., & Jang, H. J. (2020). Anti-inflammatory effect of *Rosa laevigata* extract on in vitro and in vivo model of allergic asthma via the suppression of IgE and related cytokines. *Molecular & Cellular Toxicology* 2020, 16(2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/S13273-019-00063-8>
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, V. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41, Artículo e 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>

- Li, Y., Huang, X., Luo, L., & Shang, C. (2022). Optimization of Extraction Conditions of Carotenoids from *Dunaliella parva* by Response Surface Methodology. *Molecules*, 27(4), 1444. <https://doi.org/10.3390/molecules27041444>
- Lohvina, H., Sándor, M., & Wink, M. (2022). Effect of ethanol solvents on total phenolic content and antioxidant properties of seed extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) varieties and determination of phenolic composition by hplc-esi-ms. *Diversity*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.3390/d14010007>
- Lourenço, S. C., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Applications. *Molecules*, 24(22), 4132. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24224132>
- Mahendran, S., Sankaralingam, S., Maheswari, P., Annalakshmi, P., Pandiarajan, J., Seethapathy, P., Harinathan, B., Palpperumal, S., Yasothkumar, N., & Venkatesh, S. (2022). Isolation and purification of phycocyanin pigments from *Spirulina* sp. biomass and evaluation of its anticancer and antioxidant potential. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2022, 1–11. <https://doi.org/10.1007/S13399-022-02765-X>
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, Artículo e125124. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125124>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/S11418-019-01364-X/FIGURES/15>
- Mariano, M., Mayta, E., Montoya, H., & Tarazona, R. (2017). Crecimiento poblacional y productividad de la microalga nativa *Chlorella peruviana* bajo Diferentes Salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(4), 976–986. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371854393023>
- Marrez, D. A., Naguib, M. M., Sultan, Y. Y., & Higazy, A. M. (2019). Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. *Heliyon*, 5(3), Artículo e01404. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01404>

- Martinello, M., Mutinelli, F., Zooprofilattico, I., & Delle Venezie, S. (2021). Antioxidant Activity in Bee Products: A Review. *Antioxidants* 2021, 10(1), 71. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX10010071>
- Matsuo, Y., Miura, L. A., Araki, T., Riffault-Valois, L., & Yoshie-Stark, Y. (2020). Comparison of Antioxidant Properties of Different Crude Extracts from *Citrus natsudaidai* Peel. *Food Science and Technology Research*, 26(6), 837–846. <https://doi.org/10.3136/FSTR.26.837>
- Mercado-Mercado, G., de la Rosa, L. A., & Alvarez-Parrilla, E. (2020). Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. *Journal of Molecular Structure*, 1199, 126967. <https://doi.org/10.1016/J.MOLSTRUC.2019.126967>
- Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1290. <https://doi.org/10.1111/BPH.13625>
- Monteiro, M., Santos, R. A., Iglesias, P., Couto, A., Serra, C. R., Gouvinhas, I., Barros, A., Oliva-Teles, A., Enes, P., & Díaz-Rosales, P. (2020). Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 349–362. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01927-1>
- Morais-Junior, W. G., Gorgich, M., Corrêa, P. S., Martins, A. A., Mata, T. M., & Caetano, N. S. (2020). Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing. *Aquaculture*, 528, Artículo e735562. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735562>
- Mousavian, Z., Safavi, M., Azizmohseni, F., Hadizadeh, M., & Mirdamadi, S. (2022). Characterization, antioxidant and anticoagulant properties of exopolysaccharide from marine microalgae. *AMB Express*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01365-2>
- Mukherjee, C., Suryawanshi, P. G., Kalita, M. C., Deka, D., Aranda, D. A. G., & Goud, V. V. (2022). Polarity-wise successive solvent extraction of *Scenedesmus obliquus* biomass and characterization of the crude extracts for broad-spectrum antibacterial activity. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–17.

<https://doi.org/10.1007/S13399-022-02432-1>

- N'guessan, B. B., Asiamah, A. D., Arthur, N. K., Frimpong-Manso, S., Amoateng, P., Amponsah, S. K., Kukuia, K. E., Sarkodie, J. A., Opuni, K. F. M., Asiedu-Gyekye, I. J., & Appiah-Opong, R. (2021). Ethanolic extract of *Nymphaea lotus* L. (Nymphaeaceae) leaves exhibits in vitro antioxidant, in vivo anti-inflammatory and cytotoxic activities on Jurkat and MCF-7 cancer cell lines. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12906-020-03195-W>
- Nawaz, H., Nawaz, H., Aslam Shad, M., Rehman, N., Andaleeb, H., & Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *J. Pharm. Sci*, 56, 17129. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>
- Neelam, Khatkar, A., & Sharma, K. K. (2019). Phenylpropanoids and its derivatives: biological activities and its role in food, pharmaceutical and cosmetic industries. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 60(16), 2655–2675. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1653822>
- Norzagaray-Valenzuela, C. D., Valdez-Ortiz, A., Shelton, L. M., Jiménez-Edeza, M., Rivera-López, J., Valdez-Flores, M. A., & Germán-Báez, L. J. (2016). Residual biomasses and protein hydrolysates of three green microalgae species exhibit antioxidant and anti-aging activity. *Journal of Applied Phycology* 2016, 29(1), 189–198. <https://doi.org/10.1007/S10811-016-0938-9>
- Osei Akoto, C., Acheampong, A., Boakye, Y. D., Naazo, A. A., & Adomah, D. H. (2020). Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Anthelmintic Activities of *Ocimum basilicum* (Sweet Basil) Fruits. *Journal of Chemistry*, 2020, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2020/2153534>
- Papry, R. I., Ishii, K., Mamun, M. A. Al, Miah, S., Naito, K., Mashio, A. S., Maki, T., & Hasegawa, H. (2019). Arsenic biotransformation potential of six marine diatom species: effect of temperature and salinity. *Scientific Reports*, 9(1), 10226. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-46551-8>
- Park, W. S., Kim, H. J., Li, M., Lim, D. H., Kim, J., Kwak, S. S., Kang, C. M., Ferruzzi, M. G., & Ahn, M. J. (2018). Two classes of pigments, carotenoids and

- c-phycoyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. *Molecules*, 23(8), 2065. <https://doi.org/10.3390/molecules23082065>
- Parolini, M. (2020). Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review. *The Science of the Total Environment*, 740, Artículo e140043. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.140043>
- Patil, L., & Kaliwal, B. B. (2019). Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(6), 979–994. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02099-5>
- Pavlov, A. (2019). Plant cells and algae in bioreactors III. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 828. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201900155>
- Pina-Pérez, M. C., Úbeda-Manzanaro, M., Beyrer, M., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2022). In vivo Assessment of Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology on the Bioactivity of *Spirulina*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 4341. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.781871>
- Prabakaran, G., Sampathkumar, P., Kavisri, M., & Moovendhan, M. (2020). Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009>
- Rajput, A., Singh, D. P., Khattar, J. S., Swatch, G. K., & Singh, Y. (2021). Evaluation of growth and carotenoid production by a green microalga *Scenedesmus quadricauda* PUMCC 4.1.40. under optimized culture conditions. *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100285>
- Rosen, M. A., Yusaf, T., Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A., & Olabi, A. G. (2022). Evaluation of Growth Rate and Biomass Productivity of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* under Different LED Wavelengths and Photoperiods. *Sustainability* 2022, 14(10), 6108. <https://doi.org/10.3390/SU14106108>

- Salinas-Salazar, C., Garcia-Perez, J. S., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Methods for extraction of valuable products from microalgae biomass. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, 245–263. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_11)
- Sarwa, P., & Verma, S. K. (2017). Identification and Characterization of Green Microalgae, *Scenedesmus* sp. MCC26 and *Acutodesmus obliquus* MCC33 Isolated From Industrial Polluted Site Using Morphological and Molecular Markers. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 5(4), 415–422. <https://doi.org/10.3126/IJASBT.V5I4.18083>
- Sasikumar, R., Das, D., & Jaiswal, A. K. (2021). Effects of extraction methods and solvents on the bioactive compounds, antioxidant activity, and storage stability of anthocyanin rich blood fruit (*Haematocarpus validus*) extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(5), Artículo e15401. <https://doi.org/10.1111/JFPP.15401>
- Scaglioni, P. T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V. B., Abreu, P. C., & Badiale-Furlong, E. (2018). Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 344–353. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5495>
- Sepahpour, S., Selamat, J., Manap, M. Y. A., Khatib, A., & Razis, A. F. A. (2018). Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. *Molecules* 2018, 23(2), 402. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23020402>
- Shanmugam, M., Ganesan, A. R., & Rajauria, G. (2021). Extraction Technologies to Recover Dietary Polyphenols from Macro- and Microalgae. *Recent Advances in Micro and Macroalgal Processing*, 163–187. <https://doi.org/10.1002/9781119542650.CH7>
- Show, K.-Y., Yan, Y.-G., & Lee, D.-J. (2019). Algal biomass harvesting and drying. En A. Pandey, J. Chang, C. Soccol, A. Lee & Y. Chisti, *Biofuels from Algae*, 135–166. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00007-X>

- Silva, M. R. O. B. da, Moura, Y. A. S., Converti, A., Porto, A. L. F., Viana Marques, D. de A., & Bezerra, R. P. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. *Algal Research*, 58, Artículo e102396. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102396>
- Singh, R., Parihar, P., Singh, M., Bajguz, A., Kumar, J., Singh, S., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2017). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 515. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00515>
- Soni, R. A., Sudhakar, K., & Rana, R. S. (2019). Comparative study on the growth performance of *Spirulina platensis* on modifying culture media. *Energy Reports*, 5, 327–336. <https://doi.org/10.1016/J.EGYR.2019.02.009>
- Stoia, M., & Oancea, S. (2022). Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends. *Antioxidants*, 11(4), 638. <https://doi.org/10.3390/antiox11040638>
- Suasnavas, J., Flores, R., Echeverría, I., & Central, Q. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC. *Química Central*, 6(1), 57–66. <https://doi.org/10.29166/QUIMICA.V6I1.1416>
- Suasnavas, J., Ronny, F., & Echevería, I. (2018). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de microalgas usando cepas ATCC. *Química Central*, 6(1), 57–66. <https://doi.org/10.29166/quimica.v6i1.1416>
- Sulaiman, C. T., & Balachandran, I. (2012). Total Phenolics and Total Flavonoids in Selected Indian Medicinal Plants. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(3), 258. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.106069>
- Taghavi-Takyar, M. B., Haghghat Khajavi, S., & Safari, R. (2019). Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT*, 100, 244–249. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.10.079>
- Tanaka, S., Yashiki, K., Nakahara, T., & Miyasaka, H. (2019). Bioactivities of the

- Hydrous Ethanol Extract From Marine Green Alga *Chlamydomonas* Sp. W80. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 9, 118–125. <https://fortuneonline.org/articles/bioactivities-of-the-hydrous-ethanol-extract-from-marine-green-alga-chlamydomonas-sp-w80.html>
- Tiong, I., Ru, K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Effendy, M., Wahid, A., Nagappan, T., & Sung, Y. (2020). *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2–11. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Torres-da Silva, M. E., Martins, M. A., De Oliveira Leite, M., Milião, G. L., Sélia, J., & Coimbra, R. (2021). Microalga *Scenedesmus obliquus*: extraction of bioactive compounds and antioxidant activity. *Revista Ciência Agronômica*, 52(2), 1–8. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20210036>
- Trentin, R., Custódio, L., Rodrigues, M. J., Moschin, E., Sciuto, K., da Silva, J. P., & Moro, I. (2022). Total Phenolic Levels, *In Vitro* Antioxidant Properties, and Fatty Acid Profile of Two Microalgae, *Tetraselmis marina* Strain IMA043 and *Naviculoid Diatom* Strain IMA053, Isolated from the North Adriatic Sea. *Marine Drugs*, 20(3), 207. <https://doi.org/10.3390/md20030207>
- Tsouko, E., Alexandri, M., Fernandes, K. V., Freire, D. M. G., Mallouchos, A., & Koutinas, A. A. (2019). Extraction of Phenolic Compounds from Palm Oil Processing Residues and Their Application as Antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, 57(1), 29. <https://doi.org/10.17113/FTB.57.01.19.5784>
- Vanderwall, A. G., & Milligan, E. D. (2019). Cytokines in Pain: Harnessing Endogenous Anti-Inflammatory Signaling for Improved Pain Management. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.03009>
- Ventura, S. P. M., Nobre, B. P., Ertekin, F., Hayes, M., Garcíá-Vaquero, M., Vieira, F., Koc, M., Gouveia, L., Aires-Barros, M. R., & Palavra, A. M. F. (2017). Extraction of value-added compounds from microalgae. En C. Gonzales-Fernandez & R. Muñoz (Ed.), *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts: From Feedstock Cultivation to End-Products* (pp. 461–483). <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00019-4>
- Verdugo-González, L., Acosta-Cárdenas, A., Zapata-Zapata, A. D., Cadena-



- Chamorro, E. M., Pulido-Muñoz, S. A., Verdugo-González, L., Acosta-Cárdenas, A., Zapata-Zapata, A. D., Cadena-Chamorro, E. M., & Pulido-Muñoz, S. A. (2019). Antimicrobial potential of a hydrolyzed protein extract of the microalgae *Nannochloropsis* sp. *DYNA*, 86(211), 192–198. <https://doi.org/10.15446/DYNA.V86N211.78865>
- Vicente, B., Matos, J., Gomes, R., Sapatinha, M., Afonso, C., Rodrigues, T., Amorim, A., Bandarra, N. M., & Cardoso, C. (2021). Production and bioaccessibility of *Emiliana huxleyi* biomass and bioactivity of its aqueous and ethanolic extracts. *Journal of Applied Phycology* 2021, 33(6), 3719–3729. <https://doi.org/10.1007/S10811-021-02551-8>
- Vik, A., Dalli, J., & Hansen, T. V. (2017). Recent advances in the chemistry and biology of anti-inflammatory and specialized pro-resolving mediators biosynthesized from n-3 docosapentaenoic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(11), 2259–2266. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2017.03.079>
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2021). Spirulina. En R. Gupta, R. Lall & A. Strivastava, *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity* (pp. 959–974). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821038-3.00057-4>
- Wolf, L., Cummings, T., Müller, K., Reppke, M., Volkmar, M., & Weuster-Botz, D. (2021). Production of  $\beta$ -carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Engineering in Life Sciences*, 21(3–4), 115. <https://doi.org/10.1002/ELSC.202000044>
- Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñoz-Márquez, D. B. (2020). Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>
- Yang, S., Sun, J., Gu, D., Li, P., Yao, L., Shi, D., Guo, S., & Liu, C. (2021). Antioxidant activities of sulfated Codonopsis polysaccharides in acute oxidative stress. *Journal of Food Biochemistry*, 45(12), Artículo e13974. <https://doi.org/10.1111/JFBC.13974>

Yusof, N. S., Yeong, Y. S., Zakeri, H. A., Effendy, M., Wahid, A., Nabila, S., Ghafar, A., & Yusuf, N. (2021). Photoperiod influenced the growth and antioxidative responses of *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chuii*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11(04), 125–134. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2021.110415>

Zanella, L., & Vianello, F. (2020). Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. *Journal of Functional Foods*, 68, Artículo e103919. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103919>

## Anexos

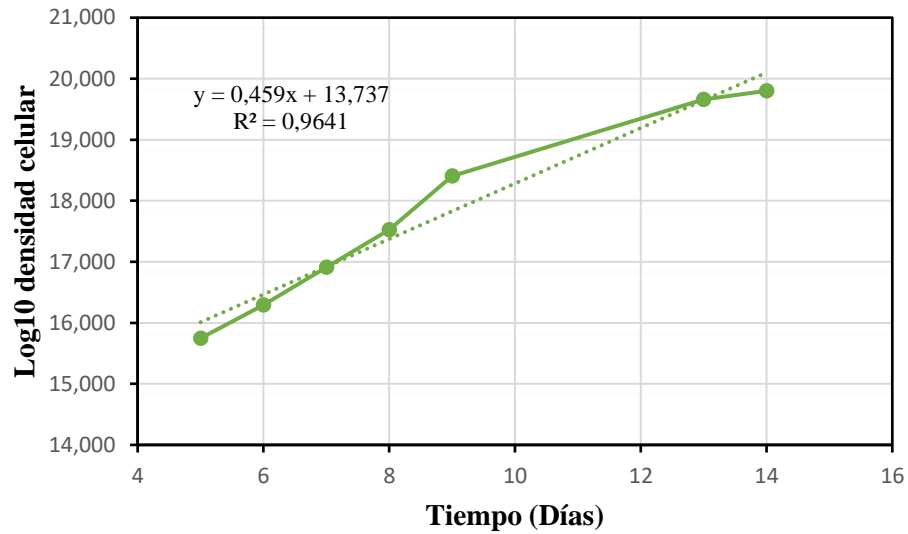
### ANEXO A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR.

**Tabla A1**

*Promedio de densidad celular de Scenedesmus sp. en medio de cultivo de fertilizante BASFOLIAR.*

Días de cultivo	Densidad celular (cel/ml)
0	1,1 x10 <sup>6</sup>
1	1,2 x10 <sup>6</sup>
2	1,5 x10 <sup>6</sup>
5	6,5 x10 <sup>6</sup>
6	1,2 x10 <sup>7</sup>
7	2,2 x10 <sup>7</sup>
8	4,1 x10 <sup>7</sup>
9	9,9 x10 <sup>7</sup>
13	3,5 x10 <sup>8</sup>
14	4,0 x10 <sup>8</sup>
15	4,1 x10 <sup>8</sup>
16	4,1 x10 <sup>8</sup>
19	4,2 x10 <sup>8</sup>
20	4,2 x10 <sup>8</sup>

**ANEXO B. Curva semilogarítmica de la fase exponencial de crecimiento de *Scenedesmus* sp. y cálculo de parámetros cinéticos.**



**Figura B1.** Fase exponencial de la curva de crecimiento de *Scenedesmus* sp.

- **Tasa de crecimiento**

$$r = \frac{LN \left( \frac{N_t}{N_0} \right)}{\Delta t}$$

$$r = 0,459 \text{ días}^{-1}$$

- **Tiempo generacional**

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

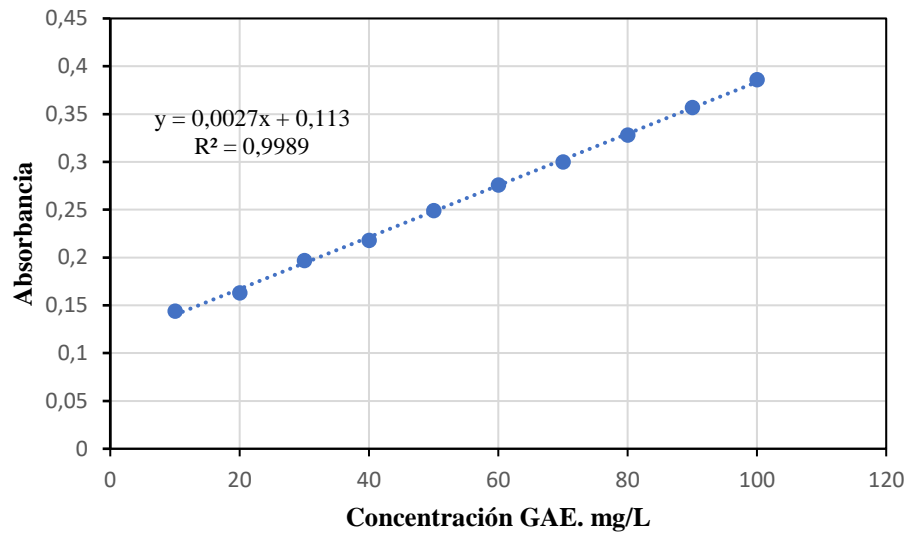
$$g = 1,509 \text{ días/división celular}$$

- **Divisiones diarias**

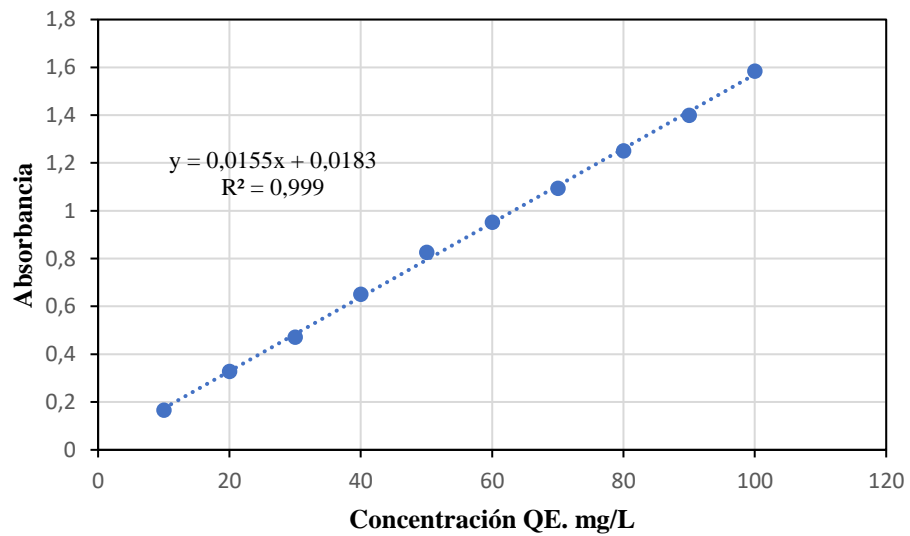
$$k = \frac{1}{g}$$

$$k = 0,663 \text{ divisiones/día}$$

**ANEXO C. Curvas de calibración para la caracterización de extractos.**



**Figura C1.** Curva de calibración de ácido gálico para cuantificación de fenoles totales.



**Figura C2.** Curva de calibración de quercetina para cuantificación de flavonoides totales.

**ANEXO D. Análisis estadístico para ensayos de caracterización de extractos.**

- **Fenoles**

**Tabla D1.** Análisis Anova para el contenido de fenoles totales en extractos microalgales.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Tipo de disolvente	910,53	2	455,265	148,70	0,0000
B: Relación Biomasa/Volumen solvente	243,694	2	121,847	39,80	0,0000
AB	47,4199	4	11,855	3,87	0,0193
RESIDUOS	55,1081	18	3,06156		
TOTAL (CORREGIDO)	1256,75	26			

**Tabla D2.** Prueba de rangos múltiples de Tukey para el contenido de polifenoles por disolvente.

<b>Tratamiento</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Etanol 80% 1:30	3	28,5523	X
Etanol 80% 1:20	3	21,8147	X
Etanol 50% 1:30	3	18,1793	X
Etanol 80% 1:10	3	17,583	X
Etanol 50% 1:20	3	16,9477	X
Etanol 50% 1:10	3	11,833	X
Agua 1:30	3	11,3673	XX
Agua 1:20	3	7,27167	XX
Agua 1:10	3	6,639	X

- **Flavonoides**

**Tabla D3.** Análisis Anova para el contenido de flavonoides totales en extractos microalgales.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Tipo de disolvente	44,5861	2	22,2931	34312,66	0,0000
B: Relación Biomasa/Volumen disolvente	60,7915	2	30,3958	46784,03	0,0000
AB	16,2505	4	4,06263	6253,05	0,0000
RESIDUOS	0,0116947	18	0,000649704		
TOTAL (CORREGIDO)	121,64	26			

**Tabla D4.** Prueba de rangos múltiples de Tukey para el contenido de flavonoides por disolvente.

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol 80% 1:30	3	7,52815	X
Etanol 80% 1:20	3	5,32041	X
Etanol 50% 1:30	3	4,52733	X
Agua 1:30	3	2,4703	X
Agua 1:20	3	1,97804	X
Etanol 50% 1:20	3	1,8432	X
Etanol 80% 1:10	3	1,55052	XX
Etanol 50% 1:10	3	1,19052	XX
Agua 1:10	3	0,7705	X

- **Carotenoides**

**Tabla D5.** Análisis Anova para el contenido de carotenoides totales en extractos microalgales.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tipo de disolvente	0,352993	2	0,176497	2914,94	0,0000
B: Relación Biomasa/Volumen disolvente	0,358865	2	0,179433	2963,43	0,0000
AB	0,160885	4	0,0402213	664,28	0,0000
RESIDUOS	0,00102933	17	0,000060549		
TOTAL (CORREGIDO)	0,935069	25			

**Tabla D6.** Prueba de rangos múltiples de Tukey para el contenido de carotenoides por disolvente.

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol 80% 1:30	3	0,660333	X
Etanol 80% 1:20	3	0,273333	X
Etanol 50% 1:30	3	0,238	X
Agua 1:30	3	0,138667	X
Etanol 80% 1:10	3	0,105333	XX
Etanol 50% 1:20	3	0,0933333	XX
Agua 1:20	3	0,0733333	X
Etanol 50% 1:10	3	0,062	X
Agua 1:10	3	0,008	X

**ANEXO E. Análisis estadístico para determinación de la actividad antioxidante  
el ensayo DPPH.**

- **Porcentaje De inhibición**

**Tabla E1.** Análisis Anova para el porcentaje de inhibición de DPPH de extractos microalgales.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Tipo de disolvente	2779,63	2	1389,82	320,87	0,0000
B: Relación Biomasa/Volumen disolvente	250,68	2	125,34	28,94	0,0000
AB	58,6153	4	14,6538	3,38	0,0313
RESIDUOS	77,9651	18	4,3314		
TOTAL (CORREGIDO)	3166,9	26			

**Tabla E2.** Prueba de rangos múltiples de Tukey para el porcentaje de inhibición de DPPH de extractos microalgales.

<b>Tratamientos</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
Etanol 80% 1:30	3	41,3933	X
Etanol 80% 1:20	3	32,7067	X
Etanol 80% 1:10	3	30,1833	XX
Etanol 50% 1:30	3	26,6067	X
Etanol 50% 1:20	3	25,01	XX
Etanol 50% 1:10	3	20,01	X
Agua 1:30	3	12,4267	X
Agua 1:20	3	9,51	X
Agua 1:10	3	7,97	X

- **µmol TE/g DW**

**Tabla E3.** Análisis Anova para µmol de TE/g DW en extractos microalgales.

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
A: Tipo de disolvente	47,4746	2	23,7373	591,68	0,0000
B: Relación Biomasa/Volumen disolvente	35,389	2	17,6945	441,06	0,0000
AB	5,90928	4	1,47732	36,82	0,0000
RESIDUOS	0,722133	18	0,0401185		
TOTAL (CORREGIDO)	89,495	26			



**Tabla E4.** Prueba de rangos múltiples de Tukey para  $\mu\text{mol}$  de TE/g DW en extractos microalgales.

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Etanol 80% 1:30	3	6,37667	X
Etanol 80% 1:20	3	4,28667	X
Etanol 80% 1:10	3	3,26667	X
Etanol 50% 1:30	3	3,00333	XX
Etanol 50% 1:20	3	2,46	X
Etanol 50% 1:10	3	1,74333	X
Agua 1:30	3	0,916667	X
Agua 1:20	3	0,836667	XX
Agua 1:10	3	0,323333	X

**ANEXO F. Análisis estadístico para determinación de la actividad antiinflamatoria con el ensayo de desnaturalización de proteínas.**

**Tabla F1.** Análisis Anova para el porcentaje de actividad de inhibición de la desnaturalización de la albúmina en el extracto hidroetanólico de *Scenedesmus* sp.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6056,82	3	2018,94	543,35	0,0000
Intra grupos	29,7259	8	3,71573		
Total (Corr.)	6086,55	11			

**Tabla F2.** Prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ) para el porcentaje de actividad de inhibición de la desnaturalización de la albúmina en el extracto hidroetanólico de *Scenedesmus* sp.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1000	3	34,9682	X
500	3	62,2092	X
200	3	79,1239	X
100	3	95,7591	X

**Tabla F3.** Análisis Anova para el porcentaje de actividad de inhibición de la desnaturalización de la albúmina del diclofenaco de sodio.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1956,16	3	652,052	143,66	0,0000
Intra grupos	36,3098	8	4,53873		
Total (Corr.)	1992,47	11			

**Tabla F4.** Prueba de rangos múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ) para para el porcentaje de actividad de inhibición de la desnaturalización de la albúmina del diclofenaco de sodio.

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1000	3	38,4196	X
500	3	20,1914	X
200	3	11,3114	X
100	3	4,33173	X

#### ANEXO G. Fotografías.

- Cultivo de a microalga *Scenedesmus* sp.

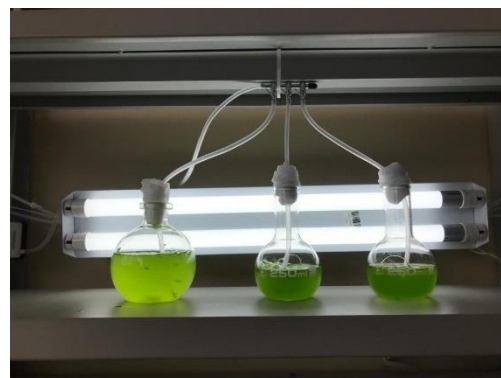
**Figura G1**

*Cultivos de mantenimiento de Scenedesmus* sp.



**Figura G2**

*Cultivos de mantenimiento 8 días de cultivo.*



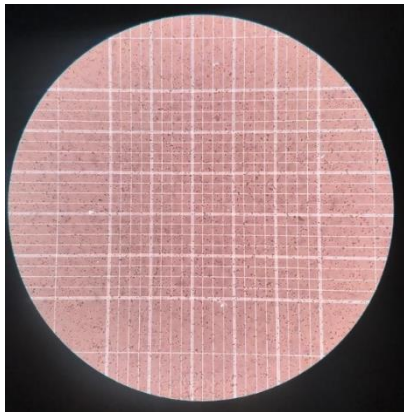
**Figura G3**  
*Resiembra en frascos de 1 Litro.*



**Figura G4**  
*Cultivos después de 15 días de cultivo.*



**Figura G5**  
*Observaciones microscópicas para conteo en Cámara de Neubauer.*



**Figura G6**  
*Toma de alícuotas para cosecha de biomasa.*



**Figura G7**  
*Sedimento de la centrifugación de las muestras.*



**Figura G8**  
*Pesaje de biomasa húmeda.*



**Figura G9**  
*Trituración de la biomasa.*



**Figura G10**  
*Pesaje de biomasa seca.*



**Figura G11**  
*Pesaje de biomasa húmeda.*



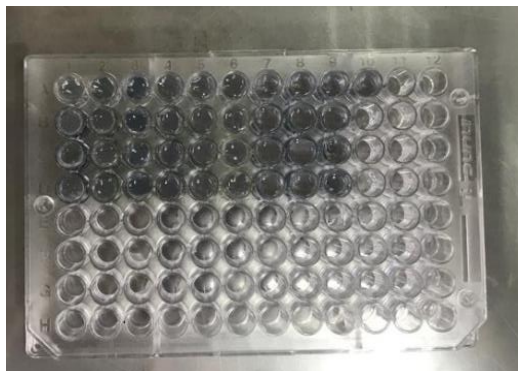
**Figura G12**  
*Agitación continua para extracción de compuestos.*



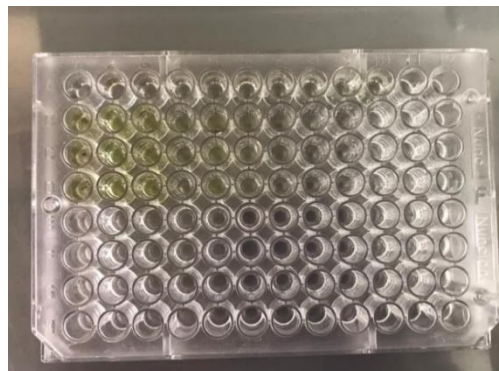
**Figura G13**  
*Filtración de extractos.*



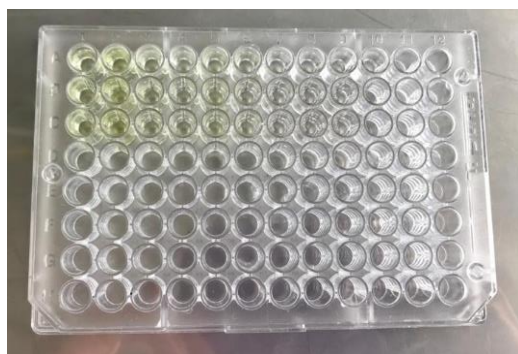
**Figura G14**  
*Ensayo Folin Ciocalteu para fenoles totales.*



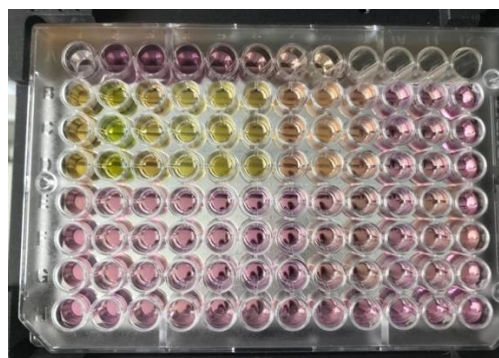
**Figura G15**  
*Ensayo del cloruro férrico para flavonoides totales.*



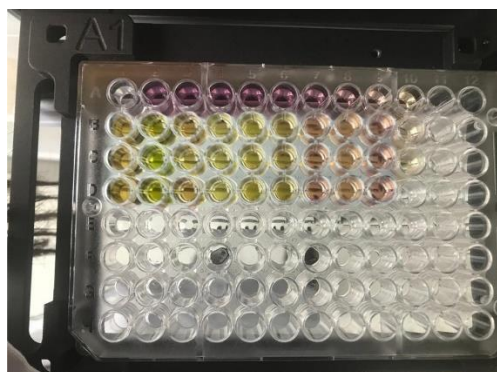
**Figura G16**  
*Ensayo para carotenoides totales.*



**Figura G17**  
*Ensayo DPPH con diferentes diluciones.*



**Figura G18**  
*Ensayo DPPH.*



**Figura G19**  
*Ensayo de desnaturalización de la albúmina.*

